

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L),
caracterización enzimática, efecto de insecticidas
organoclorados sobre su actividad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Juana María José Herranz Santos

DIRECTOR:

Manuel Ruiz Amil

Madrid, 2015

TP
1980
152

Juana María José Herranz Santos



* 5 3 0 9 8 5 4 1 8 4 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X - 23 - 044231 - 7

PIRUVATOQUINASA DE PIE DE MEJILLON (*MYTILUS EDULIS* L.).

CARACTERIZACION ENZIMATICA. EFECTO DE INSECTICIDAS ORGANOCLOREADOS

SOBRE SU ACTIVIDAD

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1980



BIBLIOTECA

© Juana María José Herranz Santos
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-3856291980

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS.
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA.

PIRUVATOQUINASA DE PIE DE MEJILLON (MYTILUS EDULIS L.).
CARACTERIZACION ENZIMATICA. EFECTO DE INSECTICIDAS ORGANOCOLORADOS
SOBRE SU ACTIVIDAD.

Memoria presentada por la licenciada
JUANA MARIA JOSE HERRANZ SANTOS para
aspirar al grado de Doctor en Ciencias
Químicas.

Director del trabajo
Prof. Dr. M. Ruiz Amil

Madrid, junio de 1.980

I

Este trabajo ha sido realizado bajo la
dirección del Prof. Dr. Manuel Ruiz
Amíl, en el Departamento de Bioquímica
de la Facultad de Veterinaria de la
Universidad Complutense de Madrid.

II

Deseo expresar mi agradecimiento:

Al Prof. Martín Municio, por haber aceptado la revisión de este trabajo y el ser ponente del mismo.

Al Prof. Ruiz Amil, director de esta Tesis Doctoral, por haberme acogido en su Departamento, por sus enseñanzas y por el constante estímulo proporcionado a lo largo de la realización de este trabajo.

Al Prof. Luque Cabrera y a la Dra. Monserrat Pinilla por sus orientaciones durante el tiempo de su permanencia en este Departamento.

A la Dra. Carmen Bautista por sus acertadas orientaciones acerca de la biología del mejillón.

Al Prof. Eldilberto Fernandez Alvarez del C.S.I.C., a la Dra. Cristina Tejedor y al Dr. Enrique Pertierra, por su eficaz ayuda en la resolución de algunos problemas planteados a lo largo de la realización de este trabajo.

A la Dra. Magdalena Galvéz, por todas las facilidades prestadas para hacer posible la conclusión de este trabajo.

Al Dr. Castillo que nos proporcionó en algunos casos el material biológico.

Al Dr. Germán Soler y a la Dra. Concepción Tejero que han participado en la revisión del mismo.

Al Prof. Barcia Goyanes por su constante apoyo y estímulo.

A Milagrosa Gallego, Estrella Ferrer, y el resto de mis compañeros del Dpto. de Bioquímica que me han ayudado a lo largo de estos años.

III

INDICE.

IV

INDICE.

Página

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| 1.- PARTE TEORICA..... | 10 |
| 1.1. MORFOLOGIA, DESARROLLO Y DISTRIBUCION DEL MYTILUS EDULIS L..... | 11 |
| 1.2. MUSCULATURA Y FUNCION DEL PIE DE MEJILLON (MYTILUS EDULIS L.)..... | 17 |
| 1.3. GLICOLISIS Y SU CONTROL METABOLICO..... | 21 |
| 1.4. PROPIEDADES DE LA PIRUVATOQUINASA. PIRUVATO - QUINASA EN MYTILUS EDULIS L..... | 33 |
| 1.5. INSECTICIDAS ORGANOCORADOS Y SU INFLUENCIA EN EL METABOLISMO ANIMAL..... | 41 |
| 1.5.1. ASPECTOS GENERALES..... | 41 |
| 1.5.2. INFLUENCIA DE INSECTICIDAS ORGANOCORADOS EN EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS..... | 52 |
| 1.5.3. INFLUENCIA DE INSECTICIDAS ORGANOCORADOS EN EL MEJILLON..... | 59 |
| 1.6 OBJETO DEL TRABAJO..... | 63 |
| 2. MATERIAL Y METODOS..... | 65 |
| 2.1. MATERIAL..... | 66 |
| 2.1.1. MATERIAL BIOLOGICO..... | 66 |
| 2.1.2. PRODUCTOS UTILIZADOS..... | 66 |
| 2.1.3. APARATOS UTILIZADOS..... | 67 |
| 2.2. METODOS..... | 69 |
| 2.2.1. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS..... | 69 |

| | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| 2.2.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATI- CA..... | 70 |
| 2.2.3. VALORACION DE PROTEINAS..... | 72 |
| 2.2.4. PRECIPITACION FRACCIONADA CON SULFATO AMONICO..... | 73 |
| 2.2.5. DIALISIS..... | 74 |
| 2.2.6. ESTABILIDAD DE LA ENZIMA..... | 74 |
| 2.2.7. PROPIEDADES ENZIMATICAS..... | 75 |
| 2.2.8. PARAMETROS CINETICOS..... | 80 |
| 2.2.9. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-150..... | 82 |
| 2.2.10. CROMATOGRAFIA DE DEAE-SEPHADEX A-50... | 85 |
| 2.2.11. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMI- DA..... | 86 |
| 2.2.12. EXPLORACION DE LOS NIVELES DE INSECTI- CIDAS ORGANOCORADOS EN MEJILLON POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO..... | 91 |
| 2.2.13. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PI RUVATOQUINASA EN PRESENCIA DE INSECTI- CIDAS ORGANOCORADOS..... | 97. |
| 2.2.14. VALORACION DE DATOS..... | 100 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSION..... | 101 |
| 3.1. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LA PIRUVATOQUINA SA DE PIE DE MEJILLON (MYTILUS EDULIS L.)..... | 102 |
| 3.1.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION..... | 102 |
| 3.1.1.1. EXPLORACION DE LA PIRUVATOQUI- NASA DE DISTINTOS ORGANOS DE MEJILLON..... | 103 |

VI

| | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| 3.1.1.2. VARIACION ESTACIONAL DE LA ACTI- VIDAD DE LA PIRUVATOQUINASA Y CONTENIDO EN PROTEINAS EN PIE DE MEJILLON. | 105 |
| 3.1.1.3. ESTABILIDAD DE LA PIRUVATOQUI- NASA DE PIE DE MEJILLON..... | 108 |
| 3.1.1.4. PURIFICACION PARCIAL DE LA EN- ZIMA..... | 111 |
| 3.1.2. PROPIEDADES ENZIMATICAS..... | 115 |
| 3.1.2.1. EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVI- DAD ENZIMATICA..... | 115 |
| 3.1.2.2. EFECTO DEL PH SOBRE LA ESTABI- LIDAD DE LA ENZIMA..... | 116 |
| 3.1.2.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA..... | 120 |
| 3.1.2.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA... | 120 |
| 3.1.3. COOPERATIVIDA Y ALOSTERISMO. PARAMETROS CINETICOS..... | 124 |
| 3.1.3.1. COOPERATIVIDAD POSITIVA DEL SUS- TRATO FOSFOENOLPIRUVATO (PEP) .. | 125 |
| 3.1.3.2. DETERMINACION DE $K_{SO,5}$ | 133 |
| 3.1.3.3. EFECTORES ALOSTERICOS..... | 136 |
| 3.1.4. INVESTIGACION DE ISOENZIMAS...? | 155 |
| 3.1.4.1. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-150 Y DEAE-SEPHADEX A-50..... | 156 |

VII

Página

| | |
|---|-----|
| 3.1.4.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIA CRILAMIDA..... | 160 |
| 3.1.4.3. ACTIVIDAD RESIDUAL A LA TEMPE- RATURA DE SEMIINACTIVACION EN FUNCION DEL TIEMPO..... | 163 |
| 3.2. EFECTO DE INSECTICIDAS ORGANOCOLORADOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PIRUVATOQUINASA DE PIE DE MEJI LLON (MYTILUS EDULIS L.)..... | 167 |
| 3.2.1. EXPLORACION DE LOS NIVELES DE INSECTICI DAS ORGANOCOLORADOS EN DIVERSOS ORGANOS DE MEJILLON..... | 167 |
| 3.2.2. INVESTIGACION DE LA INFLUENCIA DE INSEC TICIDAS ORGANOCOLORADOS SOBRE LA ACTIVI- DAD DE LA ENZIMA..... | 175 |
| 3.2.2.1. EFECTO DEL DISOLVENTE..... | 176 |
| 3.2.2.2. EFECTO DEL ALDRIN, ENDRIN, LIN DANO y p,p'-DDT..... | 181 |
| 3.2.2.3. EFECTO DE LA CANTIDAD DE PRO- TEINA EN LA INHIBICION PRODUCI DA POR EL DIELDRIN..... | 188 |
| 3.2.3. EFECTO DEL DIELDRIN EN LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA ENZIMA..... | 192 |
| 3.2.3.1. TIPO DE INHIBICION PRODUCIDA POR EL DIELDRIN..... | 193 |
| 3.2.3.2. EFECTO CONJUNTO DE DIELDRIN Y FRUCTOSA-1,6-BIFOSFATO..... | 194 |

VIII

| | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| 3.2.3.3. EFECTO DEL DIELDRIN EN PRESEN- CIA DE ALANINA Y DE ALANINA Y FRUCTOSA-1,6-BIOFOSFATO..... | 198 |
| 3.2.4. EFECTO DEL TIEMPO DE CONTACTO DEL DIEL- DRIN CON LA ENZIMA A DIFERENTES TEMPERA- TURAS..... | 199 |
| 4. CONCLUSIONES..... | 207 |
| 5. BIBLIOGRAFIA..... | 212 |

ABREVIATURAS.

| | |
|------------------|---|
| ADP | Adenosin-5'-difosfato |
| AMP | Adenosin-5'-monofosfato |
| ATP | Adenosin-5'-trifosfato |
| FbP | Fructosa-1,6-bifosfato |
| FbPasa | Fructosa bifosfatasa (EC.3.1.3.11) |
| G-6-Pasa | Glucosa-6-fosfatasa (EC. 3.1.3.9) |
| HK | Hexoquinasa (EC. 2.7.1.1.) |
| LDH | Láctico deshidrogenasa (EC 1.1.1.27) |
| NAD ⁺ | Nicotinamida-adenin-dinucleótido (oxidado) |
| NADH | Nicotinamida-adenin-dinucleótido (reducido) |
| OAA | Oxalacetato |
| PC | Piruvato-carboxilasa (EC.6.4.1.1) |
| PEP | Fosfoenolpiruvato |
| PEPCK | Fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (EC. 4.1.1.32) |
| PFK | Fosfofructoquinasa (EC. 2.7.1.11) |
| PK | Piruvatoquinasa (EC. 2.7.1.40) |
| DDT (p,p'-DDT) | 2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricoloro etano |
| DDE | 2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1-dicloro etano |
| DDD | 2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1-dicloro eteno |

INTRODUCCIÓN.

INTRODUCCIÓN.

Los moluscos bivalvos constituyen uno de los alimentos más utilizados y preferidos por el hombre desde el comienzo de su vida sobre el planeta, hecho que está ampliamente comprobado por el hallazgo de grandes residuos de conchas en las cuevas y abrigos utilizados por el hombre primitivo. Pronto, estas especies marinas se empezaron a cultivar con fines comerciales. Ya en época del Imperio Romano se cita por Plinio el Viejo la creación de bancos artificiales de ostras con ánimo de obtener rendimiento de sus cultivos. Por otra parte Inglaterra y Galicia fueron importantes suministradores de este tipo de moluscos.

En la actualidad la explotación marisquera constituye una de las principales industrias en muchos países, siendo España uno de los más importantes en este tipo de producción.

Entre los moluscos bivalvos, los mejillones, por su forma de vida -semisesil- y por su forma de alimentación - involuntaria y filtrando el alimento contenido en el agua- son unas especies ideales para su cultivo, dando mayores rendimientos por unidad de área que las especies de más altos niveles tróficos. De esta manera, el *Mytilus edulis* L. y *Mytilus galloprovincialis* L. se cultivan con éxito sobre las costas de Europa central y meridional. En países situados más al Norte como Gran Bretaña, el cultivo es menos rentable, como consecuencia de las bajas temperaturas que hace reducir la alimentación y crecimiento. En América del Norte hay poca demanda de es-

ta especie, y en Japón no se cultiva; sin embargo, el mercado mundial de este molusco puede considerarse en alza (MASON, 1.976).

La cosecha mundial de mejillones en 1.971, fue de 370.000 Tm. constituyendo el *M. edulis* L. y el *M. galloprovincialis* L. cultivados sobre la costa atlántica europea un 76 por 100 de esta producción total y el *M. galloprovincialis* L. cultivado en la costa mediterránea un 8 por 100 (FAO, 1.972).

En España se comenzaron a cultivar estas especies en Barcelona a principios de siglo y posteriormente en la década de los cuarenta se introdujo su cultivo en Galicia. En la actualidad el cultivo en esta región, es el más productivo de nuestra península, pudiendo considerarse la producción anual en 200.000 Tm. de mejillón fresco, lo que hace de España el primer país del mundo en este tipo de explotación.

Además de la importancia económica del cultivo de mejillón en nuestra península, en la actualidad se considera que la producción de dicha especie en zonas que reúnan las condiciones idóneas, puede ayudar no sólo a vencer la deficiencia de proteína en los pueblos subdesarrollados, sino también, contribuir a dar una solución a la escasez mundial de alimentos.

Resulta indudable que el cultivo de una especie de tal importancia económica, debe basarse en el conocimiento de los factores que influyen en su nutrición y desarrollo; de ahí el interés

de los estudios bioquímicos en lo que concierne al metabolismo energético. La nutrición del mejillón puede ser heterogénea y depende de las disponibilidades del entorno; pero el hecho de que esta especie almacene una gran cantidad de glucógeno resalta la importancia de las enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos.

El metabolismo energético del mejillón y su regulación es materia en auge, como parece demostrarlo el hecho de una reciente revisión realizada por GABBOTT (1.976). El hecho más significativo respecto al metabolismo de carbohidratos en *M. edulis* L. es que el lactato no es el principal producto final en anaerobiosis. La mayor parte de los estudios realizados, han dedicado su atención a investigar la regulación a nivel de la encrucijada del fosfoenolpiruvato.

La piruvatoquinasa es una enzima clave en la ruta glicolítica. El carácter regulador de esta enzima ha sido puesto de manifiesto en vertebrados (NEWSHOLME Y START, 1.973). En los moluscos bivalvos la piruvatoquinasa forma parte de una importante encrucijada metabólica; dicha encrucijada a nivel del fosfoenolpiruvato es el lugar de articulación de la transición metabólica aerobiosis-anaerobiosis.

La piruvatoquinasa se ha estudiado en músculo aductor (DE ZWAAN, 1.972; DE ZWAAN y HOLWERDA, 1.972; HOLWERDA y DE ZWAAN, 1.973; HOLWERDA y col., 1.973), manto (LIVINGSTONE y BAYNE, 1.974; LIVINGSTONE, 1.975)

y hepatopáncreas (URBIETA y RUIZ-AMIL, 1.975) de *M. edulis* L.; Las propiedades reguladoras de esta enzima y el carácter irreversible de la reacción que cataliza, hacen posible el establecimiento de su papel regulador en *M. edulis* L. a pesar de su elevada actividad catalítica en hepatopáncreas (CAMASELLE y col. 1.980).

Es conocido el hecho de la gran variabilidad respecto a la actividad, comportamiento y propiedades que presenta una misma enzima, no sólo en diferentes organismos sino además en las diferentes partes de estos organismos: tejidos, órganos e incluso diferentes clases de músculo con diferente función fisiológica, lo que justifica el estudio de la piruvatoquinasa de pie de mejillón, órgano en el que esta enzima no ha sido estudiada y en el que la naturaleza del tejido (músculo liso) hace interesante su estudio, dadas las características de este tipo de músculo en bivalvos.

Si la importancia económica del cultivo del mejillón es un hecho indiscutible, no lo es menos otro hecho ampliamente relacionado y que puede considerarse decisivo en su influencia sobre aquel: el problema de la contaminación marina.

Son numerosas las sustancias arrojadas por el hombre al medio marino, que pueden considerarse como contaminantes. Dentro de ellas los insecticidas organoclorados son una de las mas significativas, incluyéndose en este grupo unos productos ampliamente utilizados por la Industria, al menos en los últimos años.

Si nos preguntamos acerca de la procedencia de estos insecticidas en el medio marino se pueden considerar tres vías fundamentales:

- su utilización en agricultura,
- su utilización en las campañas de lucha contra el paludismo y tifus (en las cuales se usan todavía 40.000 Tm de DDT) y
- la utilización de estos productos en la vida corriente (MONOD, 1.977).

Un dato a considerar sobre lo anteriormente expuesto nos dice, que en España (1.969) fueron ordenadas 473 campañas en todo el país, siendo tratadas aproximadamente seis millones de hectáreas para combatir 108 plagas y enfermedades diferentes, utilizándose 70.000 Tm. de plaguicidas agrícolas.

Aunque el uso de insecticidas organoclorados ha sido suprimido en los países económicamente desarrollados (España: B.O.E. 24-12-1975) y reemplazados progresivamente por insecticidas biodegradables, los compuestos organoclorados son todavía ampliamente utilizados en países en vía de desarrollo, debido a su bajo coste y a un desconocimiento de medios modernos sustitutivos.

El hecho de no ser utilizados ya estos productos en nuestro país, no debe hacernos olvidar que son utilizados en nuestra "zona" por numerosos países del área mediterránea y que el mar for-

ma parte de "un todo", con lo cual el problema se mantiene y solicita vigilancia. Además, el dinamismo residual de estos compuestos es lo que ha contribuido a que se encontrase DDT en el círculo polar ártico y en especies animales, que por su habitat, parecería imposible su contaminación. Puede considerarse que el DDT, el insecticida organoclorado que ha sido usado a mayor escala, ya está repartido por toda la corteza terrestre a muy diversos niveles de concentración. Por otra parte, la fabricación de estos productos en el mundo en la última década no se puede considerar tan insignificante como sería desear. Si nos fijamos en la producción anual de DDT en 1970, (MONOD, 1977) esta se puede considerar de 100.000 Tm. año, siendo el principal país productor Estados Unidos de América con 40.000 Tm. y produciendo Francia, Italia y España 5.000 Tm.; es interesante tener en cuenta que la mayoría de los países productores se han pronunciado por el abandono de la utilización de DDT en su territorio, y que la producción es exportada en un 90 por 100 hacia países como India y China que son los principales importadores de DDT. En un reciente estudio (DIKSHITH, 1978) realizado en la India, se ha descrito la existencia de residuos de DDT en casi todos los alimentos, con niveles que pueden considerarse altos (8-83 ppm.) en 36 de 120 muestras examinadas.

Como hemos señalado anteriormente, una cantidad no despreciable de insecticidas organoclorados se encuentran en el mar y a pesar de que las dosis que puedan encontrarse en mares y océanos no parecen a primera vista tóxicas, hay que tener en cuenta la gran capacidad de concentración de estos insecticidas por los seres vivos, de tal manera que aunque se encuentren en bajas concentracio-

nes en el agua, no puede descartarse su papel nocivo en los organismos de dicho habitat.

Los moluscos bivalvos, presentan una gran sensibilidad a los compuestos organoclorados, siendo los mejillones, ampliamente distribuidos en el globo terrestre, usados en muchos casos como organismos indicadores de la contaminación marina (GOLDBERG y col., 1.978).

Con ocasión del naufragio del "*Erkowit*" (barco sudanés, transportador del insecticida "*Dieldrin-Abavit*"), en aguas de la bahía de La Coruña, se ha podido comprobar que el *M. edulis* L. es capaz de concentrar en pocos días mil veces el dieldrín presente en el agua, así como que se necesitan dos meses como mínimo para que la cantidad de dieldrín acumulada baje de 7 ppm. a 0,7 ppm.

Aunque a veces los insecticidas se han utilizado para la eliminación de ciertos parásitos nocivos a los moluscos, no obstante se ha podido comprobar que afectan de muy diversa manera al desarrollo normal de las especies comerciales, causando su muerte en gran escala.

Desde el punto de vista económico es de gran importancia la protección de las especies de moluscos que se cultivan con fines comerciales y de aquellas especies marinas que constituyen la riqueza natural de una determinada región. Teniendo en cuenta que los residuos de estos insecticidas organoclorados en moluscos bi-

valvos, no son destruidos en las preparaciones culinarias, ni eliminados en la esterilización industrial, pueden crear un serio problema para la exportación de estos moluscos, así como para el consumo nacional. Los efectos de estos insecticidas sobre dichos animales filtradores, son muy variados pudiendo alterarse numerosos procesos enzimáticos por su presencia.

En consecuencia, aunque el uso de estos insecticidas haya sido restringido, su persistencia en el medio y su alto dinamismo residual, junto con la capacidad de concentración de sus residuos por los seres vivos y de su baja tendencia a la eliminación de los mismos, hace interesantes los estudios de toxicidad de estos compuestos sobre el mejillón, fundamentalmente a nivel de su metabolismo energético.

Por otra parte, la mayoría de los trabajos realizados acerca de la influencia de insecticidas organoclorados sobre las enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos (1.5.2.), han sido llevados a cabo en ratas, mediante experiencias "*in vivo*", por adición de una determinada dosis de estos compuestos en la dieta. Es pues de interés, considerar si la influencia de insecticidas organoclorados se realiza a nivel de las actividades enzimáticas, mediante el estudio de su influencia en experiencias llevadas a cabo "*in vitro*", y si su efecto en el mejillón puede ser análogo al observado en mamíferos.

1. PARTE TEÓRICA.

1.1. MORFOLOGÍA, DESARROLLO Y DISTRIBUCIÓN DE MYTILUS EDULIS L.

El género *Mytilus* L. clasificado en 1758, pertenece a la familia *Mytilidae* que data del Triásico. La clasificación realizada por Linneo era considerablemente amplia y contenía varias especies diferentes que en la actualidad se incluyen en otros géneros.

SOOT-RYAN (1955) reconoce cuatro especies: *Mytilus edulis* L., *Mytilus californianus* C., *Mytilus crassitesta* L. y *Mytilus giganteus* N., considerando la existencia de seis subespecies entre las que se encuentra el *Mytilus galloprovinciales* L.

La especie *Mytilus edulis* L., objeto de los trabajos de la presente memoria, es una de las más abundantes dentro de la familia *Mytilidae* y se encuentra formando densas poblaciones ampliamente distribuidas.

La forma subtriangular que presentan los individuos pertenecientes a esta especie, es debida a su condición anisomiaria, con el músculo anterior muy reducido y el posterior, en posición subcentral, muy desarrollado. El hecho de ser animales que se fijan mediante las secreciones de naturaleza protéica, de una glándula bisógena, ha condicionado su carácter anisomiario. La unión de estos filamentos bisógenos al sustrato, permite a esta especie bivalva ser capaz de resistir los movimientos de agua y tensiones impuestos por las fuerzas mecánicas a las que el animal está expuesto.

Los cambios experimentados a lo largo de su evolución, reflejan una adaptación larvaria a la vida sedentaria, manifestada en la adquisición de un órgano de fijación, el biso, que es segregado por una glándula bisógena situada en la base del pie. Esto justifica en cierta forma la atrofia progresiva del músculo aductor anterior, hecho comprobable en el curso de la evolución, originándose formas anisomiarias.

Reproducción y desarrollo.

El término "ciclo reproductivo" se define como la serie completa de acontecimientos desde la activación de las gónadas mediante la gametogénesis hasta la freza y posterior descanso de las mismas. Se pueden reconocer cuatro amplios estados en el ciclo reproductivo: desarrollo, maduración, freza y descanso. El desarrollo de las gónadas comienza hacia octubre o noviembre y la gametogénesis tiene lugar en invierno. Durante los meses de primavera hay un período de freza parcial seguido de rápida gametogénesis, hasta que al principio del verano las gónadas están completamente maduras. El ciclo está sujeto a considerables variaciones anuales y estacionales. Durante la gametogénesis, estos animales se ven muy afectados por los cambios osmóticos y de salinidad del medio, aumentando los procesos de neurosecreción, que pueden ser considerados como ciclos cortos secretores y que posiblemente corresponden a descargas de media

dores químicos como la acetilcolina y la 5-hidroxitriptamina. Existe una sincronización entre el ciclo secretor y el ciclo sexual (LUBET, 1955; LUBET, 1965; LUBET y PUJOL, 1963), aumentando la actividad secretora de los ganglios cerebroideos en la fase de multiplicación de las gonias y existiendo en la fase de reposo sexual una disminución de la neurosecreción.

Por lo que respecta a la sexualidad, aparte de un ocasional hermafroditismo, el mejillón (*Mytilus edulis* L.) es un organismo dioico, presentando las hembras un color vivo y anaranjado y un tono más pálido y amarillento los machos. En ambas clases de individuos, los conductos reproductivos de las gónadas se unen en un conducto común, por el que los ovulos o el esperma se liberan espontáneamente al exterior en el tiempo de la maduración, y la fecundación tiene lugar en el agua.

En las fases que se suceden a lo largo del desarrollo, el primer estadio corresponde a una larva trocófora, a la que sucede una larva veliger antes de la secreción, por la glándula conchifera de la primera concha larval. Sucede inmediatamente la formación de una segunda concha, que presenta líneas de crecimiento y es segregada cíclicamente por el manto. Una vez que la segunda concha ha comenzado a formarse, la larva recibe el nombre de "veliconcha". En este estadio la locomoción se realiza por medio de un lóbulo velar, pero a medida que la larva se aproxima a la metamorfosis, desarrolla un organo pedal y cuando éste llega a ser funcional, se la denomina "pediveliger". En este estado larval, existen asociadas con el pie

nueve clases de glándulas, cada una con un papel específico en el asentamiento de las larvas.

En la metamorfosis se produce la secreción de los filamentos bisales (LANE y NOTT, 1975), la desaparición del velo, la formación de los palpos labiales y la reorientación de la cavidad del manto. Después de la metamorfosis, comienza la secreción de la concha de adulto y a este estado postlarval se le conoce con el nombre de plantigrado.

STRAHMAM (1974) y CRISP (1975), han estudiado las ventajas que pueden presentar los varios tipos de desarrollo larval en invertebrados marinos. En el caso de los mejillones, señalan que en su estrategia reproductiva hay alta fecundidad, fertilización externa, y una ventaja trófica ya que las larvas se alimentan de organismos en suspensión; todo lo cual lleva consigo mejores posibilidades para una amplia dispersión y una más rápida recuperación del daño a una población, puesto que las larvas recolonizan el área desde fuera.

Respecto a los datos bioquímicos en tejidos larvales de *M. edulis*, una de las características que más llama la atención, es la alta proporción de lípidos y la relativamente baja proporción de hidratos de carbono. La energía producida por los lípidos en su catabolismo equivale al doble del rendimiento energético obtenido cuando se catabolizan proteínas o hidratos de carbono, lo que supone una ventaja del almacenamiento de lípidos en las larvas (CRISP, 1975). Además, es claro que se necesita un considerable almacén de lípi-

dos y/o proteínas para que las larvas sean capaces de sobrevivir durante un día o dos sin alimentarse. Los lípidos derivan en parte de la hembra progenitora y son depositados en el huevo durante la vitellogenesis y en parte proceden del alimento asimilado durante la vida larval.

La duración de la vida larval, varía con la temperatura y el alimento. Las larvas de *M. edulis*, que nadan libremente en su medio, pueden retardar su establecimiento hasta que encuentran un sustrato aceptable, alargando el tiempo de duración de su existencia planctónica. BAYNE (1964), señala que los mejillones pasan sucesivamente del plancton a otros lugares de unión temporales sobre algas filamentosas y de aquí, mediante una fase secundaria pelágica, a sitios de unión permanentes sobre lechos de adultos ya establecidos.

Distribución geográfica y local.

Algunos factores tales como la salinidad o disponibilidad de un sustrato adecuado pueden limitar la abundancia de una especie, pero es fundamentalmente la temperatura del agua del mar, el factor que determina la distribución de organismos marinos. La temperatura puede afectar tanto la supervivencia de larvas y adultos como el comportamiento reproductivo y los procesos que tienen lugar durante la

metamorfosis y por ello, resulta decisiva en la distribución global de las especies. Este es el caso del *M. edulis*, encontrándose que en su distribución, el límite por el hemisferio Sur coincide aproximadamente con la superficie isoterma de 27°C, límite que está de acuerdo con la temperatura máxima conocida para la supervivencia de adultos. En el hemisferio Norte no está claramente definido, pero puede citarse el caso del fiordo Hebrón en la península del Labrador, donde los mejillones permanecen congelados a -20°C de seis a ocho meses durante el año (WILLIAMS, 1970). Esta especie se encuentra extendida por todas las costas de Europa, siendo España, Holanda y Francia países que sobresalen en este tipo de producción.

M. edulis se localiza en aguas litorales y sublitorales poco profundas, tanto en litoral abierto como en estuarios de aguas salobres. Vive de forma semisésil sobre diferentes sustratos: rocas, guijarros, arena compacta, etc., en general se adhiere a cualquier objeto que le proporcione un anclaje suficientemente seguro, resistiendo el oleaje y si este llega a ser muy fuerte, consigue reforzar el biso.

El límite superior de distribución en la zona litoral está marcado por factores físicos tales como la exposición al aire y la desecación. En litorales suaves pero rocosos es más fácil la supervivencia, pues durante la marea baja se forman frecuentes charcos que retienen la humedad e impiden la desecación de los organismos que habitan en esta zona.

1.2. MUSCULATURA Y FUNCIÓN DEL PIE DE MEJILLÓN (MYTILUS EDULIS L.).

Aunque la musculatura de moluscos puede considerarse primitiva, sus músculos en algunos casos son capaces de actuar de forma análoga a los de animales superiores, incluyendo los vertebrados, si comparamos el desarrollo de tensiones y duración de las contracciones. La mayor parte de sus actividades son realizadas por músculos no estriados, lo que acentúa su importancia. Pero el máximo interés descansa en el hecho de que los moluscos bivalvos tienen resuelto un problema que no parece haber sido abordado con éxito por ningún otro filo, ya que pueden mantener altas tensiones tales como la necesidad de cerrar las conchas durante períodos muy prolongados, sin un alto gasto de energía. No es sorprendente en consecuencia, el interés de la fisiología y la bioquímica en estos músculos que presentan propiedades únicas (HOYLE, 1957; HANSON y LOWY, 1960).

La mayor parte de los músculos están compuestos por células uninucleadas, pequeñas y no estriadas. También se encuentran fibras estriadas en los músculos aductores de los lamelibranquios, los cuales están compuestos en general de dos partes: una lenta y otra de aspecto vítreo con fibras estriadas de contracción rápida. Los dos tipos de fibras musculares, están a veces separados por láminas de tejido conectivo pero esta división no es muy clara y como ocurre en los músculos aductores de *M. edulis* las fibras lisas y estriadas están intermezcladas.

Los músculos aductores presentan una actividad rítmica, es decir, un período de relajamiento seguido de contracción rápida que provoca el cierre de las valvas. Las fibras nacaradas mantienen las valvas cerradas durante largas horas y se dice que sus fibras son tónicas realizando una tetanización fisiológica. Las partes vítreas son capaces de contracciones rápidas pero no duraderas. El ritmo lento del músculo aductor posterior parece tener por origen una causa intrínseca del propio músculo. El ritmo rápido del aductor anterior está sometido al control de los ganglios pleurocerebrales.

Musculatura del pie del mejillón (*Mytilus edulis* L.).

El pie y su forma terminal viene determinada por unos músculos llamados retractores posteriores que se apoyan sobre las valvas, entre dos láminas una interna y otra externa. El espacio entre las láminas internas está ocupado por un tejido conectivo, cruzado por fibras finas de un músculo transversal capaz de cargarse con sangre hemocélica. Los retractores anteriores, que están situados respectivamente a un lado y a otro de la lámina externa, sirven como protractores. El músculo retractor anterior puede tomarse como el arquetipo de músculo liso de molusco capaz de contracciones prolongadas.

Los músculos lisos constan de dos clases de filamentos:

uno grueso y otro fino. Se ha sugerido una similitud esencial en el mecanismo básico de contracción de estos músculos (retractor anterior del pie de mejillón) y de músculo esquelético de vertebrados. En ambos tipos de músculos, hay movilidad de los filamentos finos y gruesos que están entremezclados; pero también hay una diferencia fundamental que consiste en la capacidad de los filamentos gruesos en el músculo liso de moluscos, para desplazarse, puesto que no están estructuralmente ligados por completo como lo están en músculo estriado. Esto podría explicar el mayor poder de extensión y la mayor capacidad de acortamiento del músculo liso.

Función del pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.).

Los moluscos bivalvos, que han cambiado de la forma de vida primitiva infaunal a la forma epifaunal actual, pueden normalmente desplazarse sobre un sustrato duro. Este es el caso del *M. edulis* que logra, como ya hemos indicado, su fijación por medio de filamentos bisales. La secreción de la glándula bisógena fluye hacia el sustrato por un surco en el pie. Al endurecerse la fibra a causa de su exposición al agua del mar, el pie se retira, dejando el filamento anclado al sustrato por uno de los extremos y a la abertura del biso por el otro. Un músculo retractor permite al animal empujar en

sentido contrario al de su anclado. Así el *M. edulis* unido bisalmente puede lanzar el pie turgente contra el sustrato, así como tirar violentamente de los filamentos bisales y aplicando la superficie del pie al sustrato, tirar de la concha hacia adelante en movimientos rítmicos, extensibles y retráctiles.

1.3. GLICOLISIS Y SU CONTROL METABOLICO.

En general el término glicolisis se usa convencionalmente para describir la secuencia de reacciones involucradas en la degradación de carbohidratos en la célula. Es conocido que la clásica vía de Embden-Meyerhof actúa también en bivalvos y la glucosa es degradada a fosfoenolpiruvato (PEP) por las reacciones glicolíticas normales, habiéndose detectado las enzimas glicolíticas de esta ruta en varios tejidos de bivalvos marinos (BENNET y NAKADA, 1968; ENGEL y NEAT, 1970). El destino posterior del PEP depende de que la degradación continúe aeróbicamente -conversión del PEP en piruvato y entrada en el ciclo de Krebs- o anaeróbicamente en cuyo caso el PEP es convertido en alanina, vía piruvato, y en succinato, vía oxalacetato (OAA) y ciclo de Krebs en sentido contrario al normalmente operativo.

En la figura 1 pueden verse las rutas metabólicas de glicolisis y gluconeogénesis tal y como se ha establecido que operan en tejidos de vertebrados. En la secuencia glicolítica hay tres etapas o reacciones de control fisiológicamente irreversibles: las catalizadas por hexoquinasa (HK), fosfofructoquinasa (PFK) y piruvatoquinasa (PK). Estas tres reacciones exclusivas de la glicolisis (SCRUTTON y UTTER, 1968), constituyen barreras energéticas que impiden que la glicolisis pueda tener lugar en sentido inverso. Estos pasos insalvables fisiológicamente, son soslayados en la gluconeogénesis por la glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa), fructosabifosfatasa (FbPasa) y la actividad combinada de la fosfoenolpiruvatocar-

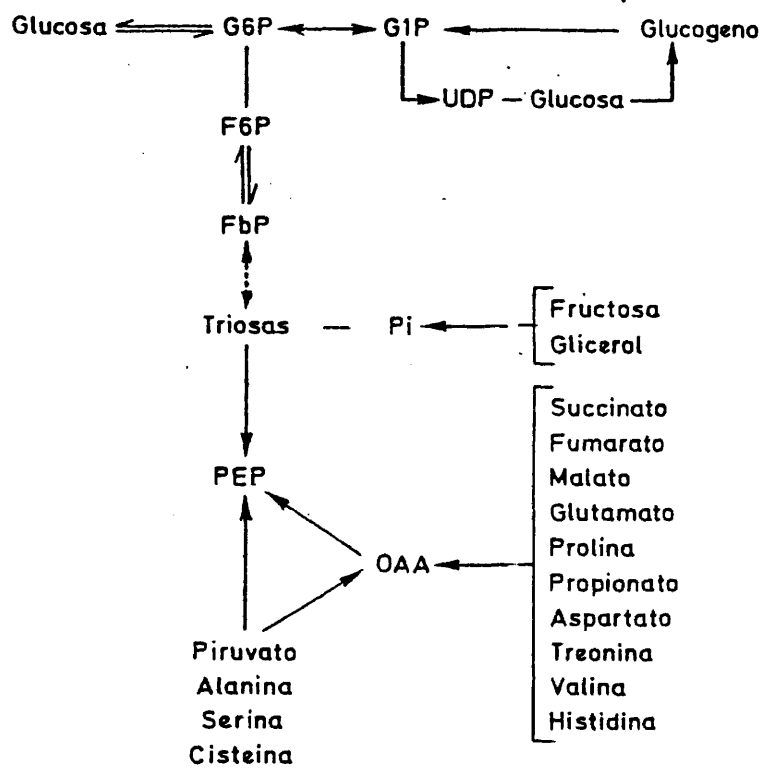


Figura 1 - Vías metabólicas de glicólisis y gluconeogénesis. Se señalan los principales precursores gluconeogénicos en los vertebrados. Según SCRUTTON y UTTER (1968).

boxiquinasa (PEPCK) y piruvatocarboxilasa (PC) respectivamente.

A partir de datos de velocidades catalíticas máximas, se puede predecir cuando las reacciones son irreversibles o de control, ya que generalmente estas enzimas tienen bajas actividades. Estos datos, junto con los de cociente de acción de masas, permiten definir sólo a HK y PFK como enzimas de control en vertebrados. PK presenta un problema; de acuerdo con los datos catalíticos, pertenece al grupo de las enzimas de alta actividad, pero los cocientes de acción de masas y los datos cinéticos sobre control alostérico en hígado (CARBONELL y col., 1.973) sugieren que cataliza una reacción irreversible.

En los bivalvos, las enzimas HK, PFK y PK tienen altas actividades en comparación con las otras enzimas de la ruta glicolítica. (BENNETT y NAKADA, 1.968), muestran que aunque PFK no es una enzima limitante, está controlada alostéricamente por ATP y es de esta manera como la PFK juega un papel importante en la regulación de la glicolisis. Estudios más recientes sobre la regulación alostérica de la PK en manto y músculo aductor de *M. edulis* (DE ZWAAN, 1.972; DE ZWAAN y HOLWERDA, 1.972; HOLWERDA y DE ZWAAN, 1.973; HOLWERDA y col., 1.973; LIVINGSTONE y BAYNE, 1.974; LIVINGSTONE, 1.975) y de determinaciones de cocientes de acción de masas en hepatopáncreas (CAMESELLE y col., 1.980), han mostrado que la PK es una enzima clave en el control de la encrucijada del PEP.

GLICOLISIS EN CONDICIONES ANAEROBICAS.

La mayor parte de los organismos son capaces de, en mayor o menor grado, obtener energía metabólica en ausencia de oxígeno. En estas condiciones los hidratos de carbono constituyen el combustible utilizado, y el producto final de su degradación es el lactato. Los bivalvos se encuentran, muy frecuentemente en la zona litoral y carecen de la movilidad necesaria para salvar los períodos de exposición al aire a que se ven sometidos durante la marea baja. En estas condiciones, el consumo de oxígeno está limitado, y el metabolismo se mantiene principalmente de forma anaeróbica. La diferencia fundamental del metabolismo anaeróbico de los bivalvos, respecto a la degradación de hidratos de carbono en otros organismos, es que el producto final no es el lactato; se acumula principalmente succinato y alanina (CHEN y AWAPARA, 1.969; STOKES y AWAPARA, 1.968; HAMMEN, 1.969; MALANGA y AIELLO, 1.972; DE ZWAAN y ZANDEE, 1.972; DE ZWAAN y VAN MARREWIJK, 1973a; HAMMEN, 1.975). La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) es baja pero no está totalmente ausente. En *M. edulis* se ha detectado esta enzima (GADE y ZEBE, 1.973 ; VAN MARREWIJK y col., 1.973) y posiblemente se forma algo de lactato en condiciones anaeróbicas, pero resulta cuantitativamente de menor importancia, frente a las cantidades que se acumulan de succinato y alanina.

Diversos autores han discutido las posibles vías para la conversión de glucosa en alanina y succinato (STOKES y AWAPARA, 1.968; CHEN y AWAPARA, 1.969; HOCHACHKA y MUSTAFA, 1.972; HOCHACHKA y col., 1.973; DE ZWAAN y col., 1.973; DE ZWAAN y col., 1.975). Como resumen puede extraerse

el siguiente esquema general (figura 2): La glucosa se convierte en PEP por la vía clásica de Embden-Meyerhof y entonces el PEP (no el piruvato) es el lugar de articulación de la transición aerobiosis-anaerobiosis. Comenzando desde la glucosa, tres carbonos del succinato proceden del PEP y lo mismo los tres carbonos de la alanina, mientras que el cuarto carbono del succinato procede de una molécula de CO_2 . En *M. edulis* el principal punto de fijación del CO_2 es la conversión del PEP en OAA por la PEPCK, siendo mucho más bajas las actividades de PC y enzima málico (VAN MARREWIJK y col., 1.973; DE ZWAAN y VAN MARREWIJK, 1973b). Así mismo, manto, músculo aductor y hepatopáncreas de *M. edulis* tienen una PK activa (VAN MARREWIJK y col., 1.973; LIVINGSTONE y BAYNE, 1.974; URBIETA y RUIZ-AMIL, 1.975), la cual en anaerobiosis compite posiblemente con la PEPCK por el PEP (DE ZWAAN y BONT, 1.975; EBBERINK y col., 1.976).

Las posibles diferencias observadas, respecto a los productos acumulados en anaerobiosis (LOXTON y CHAPLIN, 1.974) por los diferentes tejidos son debidas a su propia función específica en el organismo.

En la figura 2 se esquematizan las vías por las que discurre la degradación anaeróbica de la glucosa en *M. edulis* según proponen DE ZWAAN y colaboradores (1.973). Los productos finales son: succinato, glutamato y alanina. Este último parece ser un producto final preliminar, pues se ha demostrado que el nivel de alanina a las 24 horas de anaerobiosis es el mismo que después de 48 horas, mientras que los niveles de glutamato y succinato continúan

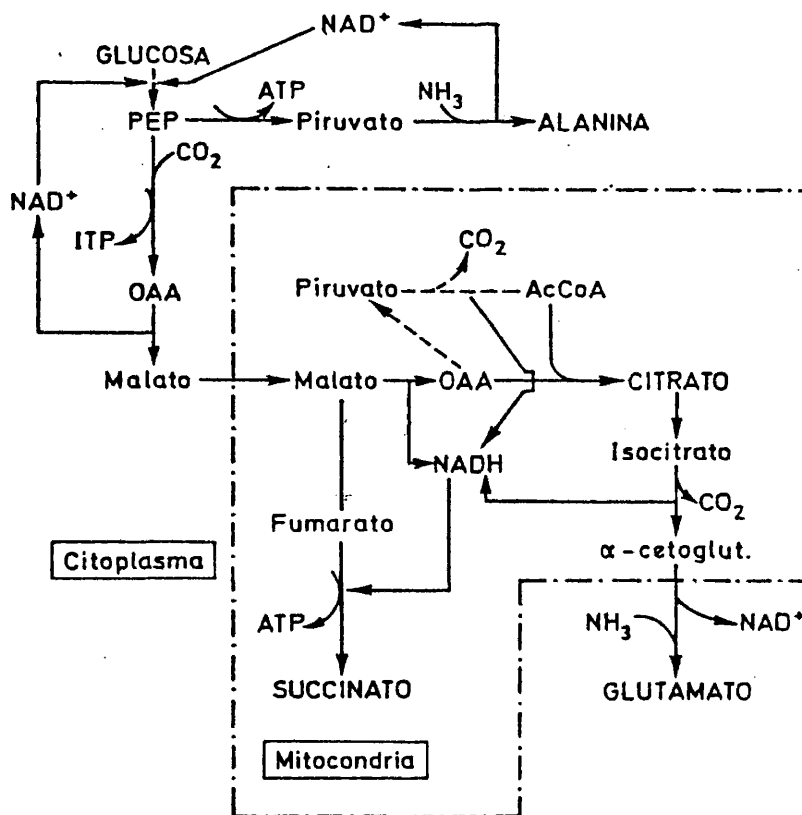


Figura 2 - Degradación anaeróbica de la glucosa en mejillón (*Mytilus edulis* L.) (esquema propuesto por DE ZWAAN y col., 1973).
Explicación en el texto.

aumentando (DE ZWAAN y colaboradores 1973). A excepción de la alanina formada y de una pequeña cantidad de lactato todo el PEP se transforma en OAA y este se reduce a malato en el citoplasma (tal vez también una pequeña cantidad de PEP se transforma en Acetil-CoA vía piruvatóquinasa para permitir la formación de citrato según el esquema de la figura 2). La transformación de OAA en malato cubre la necesidad de regenerar el NAD^+ que está siendo reducido en la reacción de la gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa, la cual forma parte del esquema de Embden-Meyerhof. De esta manera se conserva el estado redox (NADH/NAD^+) en el citoplasma. En la mayor parte de los organismos no bivalvos esta función es desempeñada por la LDH que reduce el piruvato a lactato en anaerobiosis. Por esta misma razón puede postularse que la formación de alanina debe incluir la oxidación de un mol de NADH por mol de aminoácido acumulado. Se desconoce casi todo respecto a la transformación del piruvato en alanina en bivalvos pero pueden apuntarse dos posibilidades: la existencia de una alanina deshidrogenasa, o bien la acción combinada de la glutamatopiruvato transaminasa y la glutamato deshidrogenasa, con el mismo resultado final.

Continuando con el esquema propuesto por DE ZWAAN, el malato entraría en la mitocondria y se transformaría parcialmente en succinato, a través de dos reacciones del ciclo de Krebs en sentido inverso al operativo, y parcialmente en glutamato, por medio de otras reacciones del ciclo de Krebs ahora en sentido normal, (hasta el nivel de α -cetoglutarato, pasando al citoplasma, dando lugar al glutamato). Esta bifurcación a nivel de malato intramitocondrial

permite postular el mecanismo por el que se mantiene el estado redox en este compartimento: entre malato y succinato se oxida un NADH en la reacción final por cada succinato formado, y entre malato y α -cetoglutarato se reducen 3NAD^+ por cada glutamato formado (reacciones de la malato deshidrogenasa mitocondrial, piruvato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa). Con esta hipótesis concuerda el hecho de que se forman tres moles de succinato por mol de glutamato en anaerobiosis.

En opinión de los autores, el esquema propuesto por ellos para el metabolismo de los hidratos de carbono en anaerobiosis en *M. edulis* presenta diversas ventajas respecto a la producción del ácido láctico según el esquema clásico de Embden-Meyerhof: a) el ácido succínico es un ácido más débil que el ácido láctico y su acumulación en el fluido extrapaleal provocaría un menor ataque del carbonato cálcico de la concha; b) el ácido succínico como intermediario del ciclo de Krebs, puede ser oxidado fácilmente al restablecerse las condiciones aeróbicas; c) la formación de alanina favorece la "destoxicación" de NH_3 . El amoníaco es el principal producto final del catabolismo de proteínas y es excretado en el agua del mar en condiciones aeróbicas; d) con la reducción de fumarato a succinato se introduce una posibilidad nueva para la producción de ATP a partir de glucosa.

La respuesta del metabolismo de *M. edulis* en condiciones anaeróbicas, mantiene actualmente un gran interés, investigándose en estas condiciones, los productos que se acumulan, las diferen-

cias existentes en diferentes tejidos, así como la variación con el tiempo y las estaciones, y comparando la respuesta en otros organismos respecto a las condiciones anaeróbicas.

Una reciente revisión realizada por DE ZWAAN y WIJSMAN (1976), indica que durante el metabolismo anaeróbico se acumulan, alanina, piruvato, octopina, succinato, lactato, acetato, propionato y CO_2 . WIDDOWS y col., (1979) encuentran que los principales productos acumulados son alanina, succinato y propionato, que son los mismos que los detectados por KLUYTMANS y col. (1977), quienes observan variaciones considerables respecto a los niveles iniciales en los productos acumulados y en los diferentes tejidos de *M. edulis*. AHMAD y CHAPLIN (1979) plantean su estudio respecto a las variaciones estacionales en el metabolismo anaeróbico de *M. edulis*.

CONTROL METABOLICO DE LA GLICOLISIS.

Los mayores avances sobre regulación metabólica, se han conseguido en los últimos diez o quince años, siendo uno de los logros más significativos de la enzimología, la identificación de las enzimas reguladoras que hacen posible el control y la integración de la actividad de sistemas multienzimáticos. Así, actualmente es posible presentar un cómputo generalmente aceptable para el control del metabolismo de carbohidratos. La regulación metabólica, es un mecanismo de control que relaciona las rutas metabólicas con las condiciones bioquímicas particulares de la célula y eventualmente con las necesidades de los organismos; tales puntos de regulación

son lugares para la interacción con el medio ambiente externo, dando lugar a cambios evolutivos y a diferencias entre las especies.

Como ya hemos indicado, la regulación metabólica está ampliamente relacionada con el control de actividades enzimáticas y hay dos formas por las que se puede lograr: control de la cantidad de enzima y variación de la actividad de la enzima. El primer método es lento y representa el control "grosero". El segundo es rápido y constituye el control "fino" o modulación de la actividad enzimática. En cualquier secuencia de reacciones bioquímicas, tales como la ruta glicolítica, solamente determinadas enzimas actúan como controles metabólicos. Las enzimas reguladoras están situadas estratégicamente, bien al comienzo de la ruta metabólica, o bien en un punto de ramificación donde dos o mas caminos divergen. Este último criterio ha sido usado para identificar PK y PEPCK (HOCHACHKA y MUSTAFA, 1972), como enzimas reguladoras.

Si la concentración de sustrato de una enzima, en una reacción irreversible cambia en sentido contrario al flujo, es decir, si cuando aumenta la concentración de sustrato el flujo decrece o viceversa, la enzima es reguladora. Sin embargo no se puede concluir diciendo que una enzima no es reguladora simplemente porque la concentración de sustrato y el flujo cambian en la misma dirección. Una enzima reguladora se puede definir (NEWSHOLME y START, 1973), como una enzima que cataliza una reacción irreversible y cuya actividad puede ser controlada por otros factores además de la concentración de sustrato. Uno de los más importantes de estos fac

tores, es la regulación "feed-back", pudiendo extenderse el mismo concepto a activación "feed-forward" por el sustrato y en sentido más amplio al control por cualquier modulador metabólico específico.

En la mayor parte de los casos las moléculas que actúan como moduladoras no tienen relación estructural con los sustratos o productos de las enzimas que ellas regulan. Entonces, las enzimas reguladoras tienen diferentes lugares de unión para el sustrato y para los distintos moduladores. Los sitios para la unión del modulador se llaman alostéricos (significando estéricamente diferentes), para señalar su separación del centro catalítico. Hay dos importantes propiedades cinéticas de enzimas reguladoras o alostéricas: a) que la variación de la velocidad de la reacción enzimática con respecto a la concentración del sustrato da lugar a representaciones sigmoidales y no hiperbólicas; la constante de Michaelis aparente es reemplazada por el valor de $K_{SO,5}$, que es la concentración de sustrato que da la mitad de la velocidad máxima, b) el efecto de moduladores positivos o negativos, disminuye o aumenta el valor de la $K_{SO,5}$. En el caso de moduladores positivos la enzima es capaz de funcionar a una velocidad más próxima a su velocidad máxima y es más sensible a pequeños cambios en la concentración de sustrato. Ocurre lo contrario para un modulador negativo y la velocidad catalítica se reduce. La mayor parte de los reguladores metabólicos hacen dos funciones: actúan como intermediarios en el camino metabólico y como reguladores específicos de enzimas "clave" en otro lugar de la ruta.

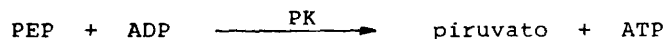
Las enzimas clave que regulan el flujo de intermediarios glicolíticos, son como ya hemos indicado, HK, PFK y PK. Entre las enzimas clave de glicolisis en bivalvos marinos (*M. edulis*), se ha prestado la mayor atención al control a nivel de la encrucijada del PEP y sobre todo en las propiedades cinéticas de la PK y PEPCK.

NEWSHOLME y START (1973), han discutido los mecanismos de regulación de glicolisis y gluconeogénesis en hígado y músculo de vertebrados, relacionándolo con el hecho de que el músculo es glicolítico mientras que el hígado es glicolítico y gluconeogénico, lo cual implica un control a nivel de tejido. De la misma manera, el significado fisiológico del mecanismo de control para glicolisis y gluconeogénesis en *M. edulis*, depende de las funciones básicas de los órganos del cuerpo.

1.4. PROPIEDADES DE LA PIRUVATOQUINASA. PIRUVATOQUINASA EN MYTILUS EDULIS L.

La PK (ATP: piruvato fosfotrasferasa, EC 2.7.1.40), está firmemente establecida como una enzima reguladora en muchos organismos y tejidos, incluyendo hígado, riñón y músculo de mamíferos (SEUBERT y SCHÖNER, 1971), leucocitos y eritrocitos humanos (VAN BERKEL y KOSTER, 1973; BLACK y HENDERSON, 1972), levadura (HAECKEL y col., 1968) y bacterias (CORNISH y JOHNSON, 1971; TOUMINEN y BERNLOHR, 1971). Por su importancia biológica no es sorprendente encontrar que la piruvatoquinasa esté sujeta a ambos tipos de controles "grosero" y "fino", incluyendo una variedad de mecanismos utilizados por los diferentes organismos en respuesta a necesidades metabólicas específicas.

La PK cataliza la reacción entre PEP y ADP dando piruvato y ATP



Es una enzima clave, responsable del mantenimiento de un balance dinámico entre glicolisis y gluconeogénesis y su papel regulador aparece más claramente cuando se considera su posición en el conjunto metabólico celular: por una parte produce energía durante el catabolismo de la glucosa y por otra puede considerarse como vía única entre dos compuestos PEP y piruvato, localizados en puntos clave del metabolismo.

Aunque en general las hexosas fosforiladas, nucleótidos de adenina y aminoácidos parecen ser los moduladores más específicos de la PK, los patrones de regulación de esta enzima son significativamente diferentes para cada tipo de organismos.

La PK de mamíferos y levaduras y algunas bacterias resulta fuertemente activada por la FbP (MALCOVATTI y KORNBERG, 1969; STEWART y MOORE, 1971; KAPOOR y TRONSGAARD, 1972; KAPOOR, 1974; KAPOOR, 1975). Otros tipos de bacterias no experimentan esta regulación, siendo los principales reguladores en estos casos AMP y ATP (TOUMINEN y BERNLOHR, 1971; IDE, 1970).

Con respecto a los mecanismos de regulación descritos para las enzimas "clave" de las rutas metabólicas, es conveniente destacar en muchos casos la presencia de formas isoenzimáticas de una determinada enzima que difieren entre sí entre otras propiedades en su mecanismo de regulación. Así pues, es frecuentemente observada en tejidos de mamíferos la presencia de isoenzimas que difieren en su sensibilidad a varios metabolitos (JACOBSON y BLACK, 1971). Mientras la mayor parte de las clasificaciones de estas isoenzimas se han basado en pruebas electroforéticas, se ha podido ver, como se ha indicado antes, un acentuado contraste en las propiedades reguladoras de la PK de hígado que muestra diferente tipo de regulación que la enzima de músculo (TANAKA y col., 1965; TANAKA y col., 1967; TAYLOR y BAYLEY, 1967; PASSERON y col., 1967; SEUBERT y col., 1968; LLORENTE y col., 1970).

Estudios cinéticos de PK (CARBONELL y col., 1973), han llevado a la identificación de tres clases de isoenzimas con diferencias cualitativas en sus propiedades reguladoras: la clase "L", fuertemente regulable, es el mayor componente en hígado, y muestra cinéticas marcadamente sigmoidales con respecto a la concentración del sustrato PEP, inhibición alostérica por ATP y alanina y activación por FbP, la clase "A" presente en tejido adiposo (MARCO y col., 1971) y que constituye el mayor componente en riñón, muestra curvas de saturación por sustrato ligeramente sigmoidales y es inhibida alostéricamente por alanina y activada por FbP; la clase "M" presente en músculo y cerebro, no manifiesta las anteriores propiedades reguladoras.

El creciente número de formas distintas de PK en tejidos animales, hace conveniente el estudio del control metabólico a nivel de la enzima, para agruparlas en clases de acuerdo con sus propiedades reguladoras. Estas clases no son únicamente variedades conformacionales de una enzima, pudiendo incluir, isoenzimas diferentes en el sentido restringido de diferencias determinadas genéticamente en la estructura primaria (IUPAC - IUB, 1971).

PIRUVATOQUINASA EN MYTILUS EDULIS L.

En *M. edulis* la enzima PK tiene propiedades que son muy similares a las de la enzima descrita como clase "L". Las propiedades cinéticas y reguladoras de la PK de *M. edulis* han sido descritas para el músculo aductor (DE ZWAAN, 1972; DE ZWAAN y HOLWERDA, 1972;

HOLWERDA y DE ZWAAN, 1973; HOLWERDA y col., 1973) y para la enzima de manto (LIVINGSTONE y BAYNE, 1974; LIVINGSTONE, 1975) y hepatopáncreas (URBIE-TA y RUIZ-AMIL, 1975). Estas enzimas procedentes de dichos tejidos en *M. edulis*, son inhibidas por alanina y ATP y activadas por FbP (figura 3). Hay algunas diferencias sin embargo, entre las enzimas *M. edulis* y la del hígado de rata con respecto a la influencia de la concentración de protones sobre la velocidad de reacción dependiente de la concentración de sustrato, así como en la influencia del pH sobre la activación por FbP (DE ZWAAN y HOLWERDA, 1972; HOLWERDA y DE ZWAAN, 1973; LIVINGSTONE y BAYNE, 1974).

Con respecto a las mencionadas enzimas de mejillón, la adición de FbP cambia la cinética de sigmoideal a hiperbólica, resultando en una activación de la PK (modulación positiva). En la enzima procedente del manto esta activación es más acentuada, siendo activada a concentraciones más bajas de este metabolito (LIVINGSTONE y BAYNE, 1974). La alanina es un potente inhibidor de la PK, que produce un aumento de la sigmoidicidad de la curva y del valor de $K_{SO,5}$ para PEP (modulación negativa). La presencia de FbP, hace desaparecer la inhibición por alanina, obteniéndose así una cinética hiperbólica y un descenso del valor de $K_{SO,5}$; entre los límites de concentraciones fisiológicas de sustrato (PEP) y modulador, la actividad de la PK sería despreciable sin la activación por FbP (DE ZWAAN, 1972). Para la enzima del manto, el efecto conjunto de alanina y FbP se manifiesta de forma más patente con respecto a los cambios de $K_{SO,5}$ para PEP (LIVINGSTONE y BAYNE, 1974). Las dos enzimas mencionadas del mejillón, son inhibidas por ATP, pero la inhibi-

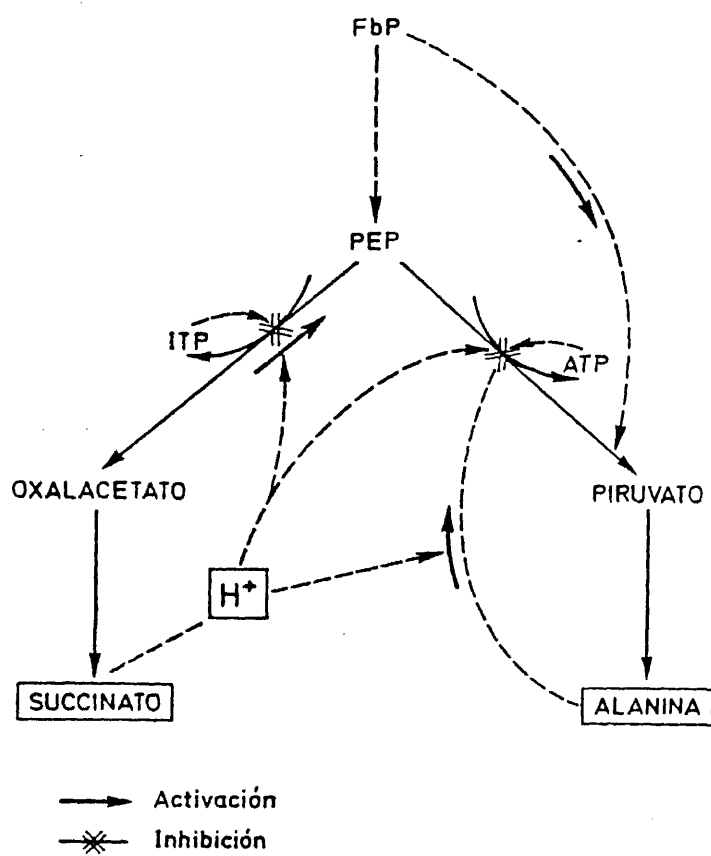


Figura 3 - Regulación de la piruvatoquinasa en mejillón

(*Mytilus edulis* L.)

Según GABBOTT (1976)

ción es contrarrestada por FbP, solo en la enzima del músculo aductor.

Estas propiedades descritas para *M. edulis* son análogas a las que se han encontrado en el molusco *Crassostrea gigas*, donde también se muestra activación por FbP e inhibición por alanina y ATP, para las enzimas del manto y músculo aductor del citado molusco, pero en ambos tejidos la PK muestra cinéticas no alostéricas, con representaciones lineales de Lineweaver-Burk (MUSTAFA y HOCHACHKA, 1971).

En *M. edulis*, en ausencia de FbP y alanina, la enzima de ambos tejidos (manto y músculo aductor), de acuerdo con lo anteriormente mencionado, muestra una marcada dependencia de la velocidad de reacción a distintas concentraciones de sustrato con respecto al pH. Estudiada la influencia del pH sobre la actividad enzimática a concentraciones saturantes de sustratos se ha obtenido pHs óptimos que oscilan entre 7-7,5 para la enzima del músculo aductor y 7,5-8 para la enzima del manto. En presencia de FbP se incrementa la actividad de la PK a bajo pH, aplanándose el perfil de la curva de actividad en función del pH, de tal manera que se puede decir que la baja actividad a altos y bajos valores de pH es contrarrestada por la presencia de FbP. La inhibición por alanina se incrementa a valores bajos de pH, en la PK de manto, siendo esta inhibición también contrarrestada por FbP (LIVINGSTONE y BAYNE, 1974).

Prácticamente, los mismos efectos de FbP con respecto a

la actividad de la enzima en función del pH, descritos en *M. edulis* han sido encontrados en las enzimas de manto y músculo aductor de *C. gigas* (MUSTAFA y HOCHACHKA, 1971).

También se han señalado, cambios estacionales de la $K_{SO,5}$ para el PEP en la enzima del manto de *M. edulis* (LIVINGSTONE y BAYNE, 1974; LIVINGSTONE, 1975). En todos los casos estudiados la $K_{SO,5}$ era mucho más alta en el verano que en el invierno. Este fenómeno puede estar relacionado con la función glicolítica y gluconeogénica de los tejidos del manto y es similar a lo encontrado en las enzimas del manto de *C. gigas*. También se encuentran diferencias con respecto a $K_{SO,5}$ para PEP en mejillones de diferentes localidades, que pueden estar relacionadas con los ciclos gametogénicos estacionales y con las oscilaciones de temperatura ambiente. Con respecto a las variaciones estacionales y locales descritas, existe un período de 3-4 meses en el verano (que corresponde al tiempo de máxima acumulación de glucógeno) en el que el valor de $K_{SO,5}$ está fuertemente aumentado en comparación con el período de invierno. ATKINSON (1971), explica este fenómeno indicando que cuando la gluconeogénesis es operativa y el PEP se produce a partir de OAA, cualquier actividad simultánea de la PK resultaría en un ciclo fútil a expensas de ATP. En los tejidos del manto este fenómeno se anula a causa del alto valor de $K_{SO,5}$ de la PK para PEP y la baja concentración que existe generalmente de FbP durante la gluconeogénesis. En contraste, la $K_{SO,5}$ para PEP de la enzima del músculo aductor, no varía estacionalmente y tiene valores bajos que son indicativos de una función glicolítica en el músculo aductor.

Resulta interesante además comparar los valores de $K_{SO,5}$ para PEP de mejillones recolectados en invierno y verano, con aquellos obtenidos para PK de hígado y músculo de mamíferos. NEWSHOLME y START (1973) describen los valores de $K_{SO,5}$ para los dos órganos de mamíferos, encontrando que el correspondiente a la enzima de hígado es considerablemente superior al de la enzima procedente del músculo. Esto proporciona una clara evidencia de que las propiedades cinéticas de la PK de manto en *M. edulis* están relacionadas con los cambios estacionales en las funciones gluconeogénicas y glicolíticas.

1.5. INSECTICIDAS ORGANOCOLORADOS Y SU INFLUENCIA EN EL METABOLISMO ANIMAL.

1.5.1. ASPECTOS GENERALES.

Los insecticidas organoclorados pueden incluirse de un modo general dentro de los compuestos "xenobióticos", (etimológicamente: ajenos o extraños a la vida) es decir, aquellos compuestos cuyas características estructurales en cierto modo contrastan, o no guardan relación con la "normativa" que rige la dinámica bioquímica de la biosfera (MASON y col., 1965).

Las características que confieren una unidad a estos compuestos, probablemente sean, el grado de biodegradabilidad y su influencia en el ecosistema. Este criterio se basa fundamentalmente en la siguiente consideración: "cuanto más tarde haya aparecido, en el transcurso de la evolución un determinado tipo molecular, menor número de entidades biológicas poseerán el dominio de sus mecanismos degradativos".

El fenómeno, tantas veces comprobado en los últimos tiempos, de la acumulación de contaminantes de elevada persistencia en los tejidos de las especies animales superiores, demuestra que la dilatada vida media residual de estas estructuras, conduce a un desajuste entre el ritmo de su ingreso en los ecosistemas y su tasa de degradación, pudiendo ser el propio desarrollo por los organismos de mecanismos adaptativos, uno de los más importantes facto

res de desajuste funcional, tanto a nivel del individuo como de población y ecosistema.

El ingreso de compuestos xenobióticos en el medio se produce a partir de muy diversos orígenes. Los desechos urbanos e industriales junto con las aplicaciones de productos fito y zoosanitarios, constituyen sin duda las contribuciones de mayor significación. De cualquier manera, los xenobióticos liberados en el medio quedan a disposición de una extensa gama de factores de orden físico, químico y biológico, cuya acción combinada tiende simultáneamente a su dispersión y degradación (figura 4). Las intensidades relativas de unos y otros procesos están relacionadas con diversas características (topográficas, edáficas, climáticas, etc.) del entorno en que se desarrollan y dependen en primer lugar de la estabilidad química del producto que se considere. Si esta estabilidad es baja y moderada, muchos de los mecanismos transportadores pueden contribuir de un modo apreciable a su degradación. Las estructuras de elevada estabilidad, por el contrario, no sólo son susceptibles de transferirse inalteradas o con leves modificaciones hasta sustratos muy alejados de su punto de ingreso (GLOTFELTY, 1978), sino que al entrar en las redes tróficas, tienden a concentrarse en los elementos de órdenes superiores (BALUJA y col., 1977; GONCZI y col., 1978).

La figura 5, elaborada con datos relativos al insecticida organoclorado DDT, ilustra una importante consecuencia práctica de estos hechos. De igual modo que entre la liberación de un contaminante y la aparición de sus efectos a nivel ecológico media un

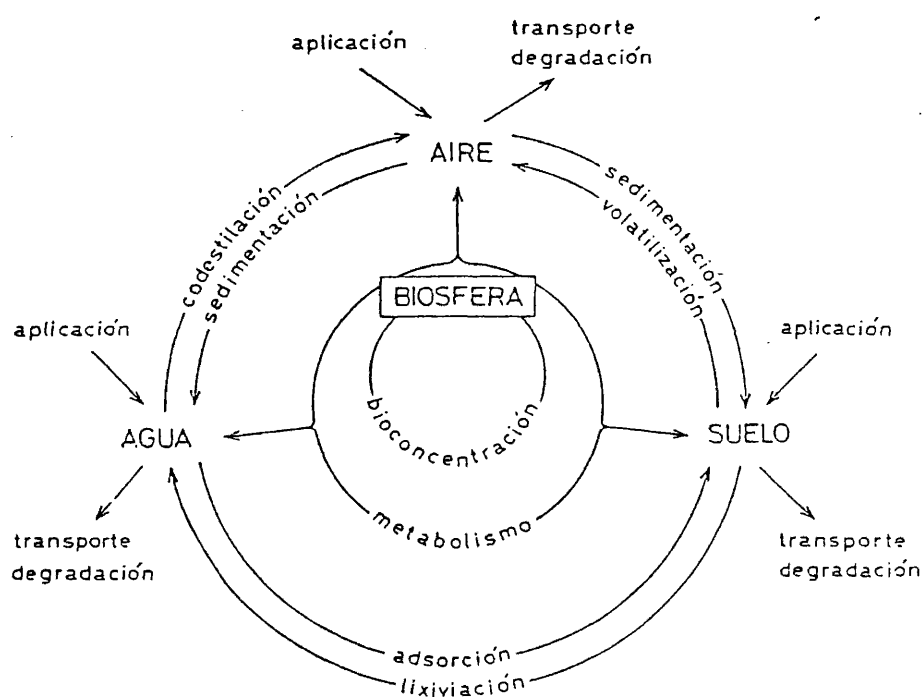


Figura 4 - Dinámica de los compuestos xenobióticos en el medio ambiente.

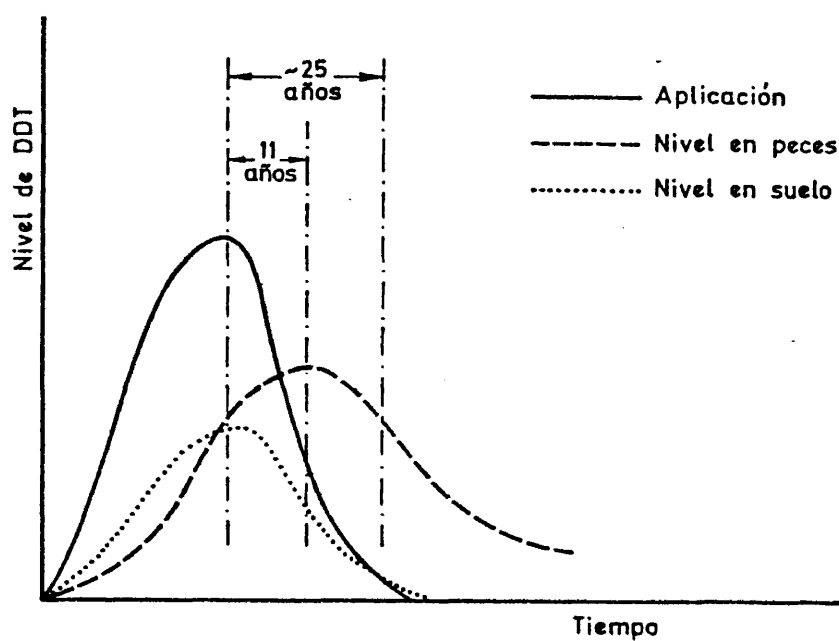


Figura 5 - Retardos en la desaparición del DDT en diferentes compartimientos del ecosistema. Según RANDERS y MEADOWS (1972). Explicación en el texto.

período de latencia a veces muy prolongado, un análogo período de "retardo" transcurre entre el momento que cesa la emisión y el cese de la sintomatología. En el caso particular señalado, significaría que los efectos del DDT sobre los peces no sólo no remitirían inmediatamente después de que la aplicación del insecticida comenzase a declinar, sino que se agudizarían, alcanzando un máximo de incidencia alrededor de los once años después de aquel momento (RANDERS y MEADOWS, 1972).

No todos los mecanismos contribuyen en la misma medida a la degradación y desactivación de los compuestos xenobióticos. Entre los de orden físico, la fotodescomposición es, sin duda, el más relevante, ya que la radiación ultravioleta de la luz solar es susceptible de alterar la configuración electrónica de los compuestos con enlaces π . Aunque las transformaciones de orden químico, desempeñan un papel más significativo, es preciso tener en cuenta que en la suavidad de las condiciones naturales (temperaturas y presiones moderadas, pH próximo a la neutralidad), incluso procesos tan conocidos como la desclorhidración del DDT en medio alcalino, o del lindano, o la epoxidación de cuerpos ciclodiénicos tales como el aldrín, isodrin y heptacloro, no suponen, cuando se considera la vía estrictamente química, demasiada importancia cuantitativa.

Los mecanismos de índole bioquímica constituyen con toda seguridad, la más importante contribución a la transformación de los compuestos xenobióticos liberados al medio. Se puede afirmar

que en una gran mayoría de los casos, los ataques que tienen lugar a través de procesos metabólicos son más veloces, como corresponden a reacciones catalizadas enzimáticamente y el mantenimiento de este tipo de procesos lleva consigo descompensaciones metabólicas o desequilibrios enzimáticos que conducen a la mencionada degradación del compuesto extraño y constituyen una forma más de alteración de la dinámica bioquímica de la biosfera.

Es difícil sin embargo que en condiciones naturales, puedan distinguirse claramente las contribuciones debidas a cada uno de los mecanismos señalados, los cuales no actúan de un modo independiente, sino cooperativo. En cualquier caso, constituye un hecho objetivo el que la permanencia de estos compuestos extraños al medio, es decir, su grado de vulnerabilidad a la interacción de los factores ya considerados, varía entre amplios límites.

INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS.

Dentro de los compuestos xenobióticos cuyos aspectos generales han sido descritos, los pesticidas constituyen un amplio grupo de estructuras químicas naturales y sintéticas. La amplitud de este grupo lleva a una división que puede realizarse en base a los organismos a los que va dirigida su acción: insecticidas, fungicidas, herbicidas, etc. Los insecticidas pueden dividirse en tres amplios subgrupos: 1) insecticidas organoclorados, 2) insecticidas organofosforados y 3) carbamatos.

Los insecticidas usados en el presente trabajo: aldrín, dieldrín, endrín, p,p'- DDT y lindano, pertenecen todos al grupo de insecticidas organoclorados. Aldrín, dieldrín y endrín forman parte del subgrupo de los insecticidas ciclodienicos. p,p'- DDT forma con un considerable número de compuestos análogos de cerrada relación estructural, otro subgrupo dentro de los insecticidas organoclorados. El lindano constituye el compuesto más importante dentro de los hexaclorociclohexanos.

Los insecticidas ciclodienicos, son hidrocarburos cíclicos clorados, con estructuras puente endometilénicas, preparados por la reacción de Diels-Alder a partir de hexaclorociclopentadieno. El desarrollo de estos productos resulta del descubrimiento de Hyman en 1945 del clordano, aducto del hexaclorociclopentadieno y el ciclopentadieno. Todos estos compuestos son cíclicos, pero a pesar de su nombre genérico solamente algunos de ellos son dienos. Comparten un anillo común cíclico totalmente clorado con el puente endometilénico también clorado uniendo los extremos del anillo y tienen además otro ciclo que puede ser o no clorado. A veces presentan dobles enlaces oxidados o más exactamente epoxidados (figura 6). El epóxido del aldrín es el dieldrín y el del isodrín es el endrín.

ALDRIN.

Es el nombre común para el insecticida técnico que contiene al menos 96 por 100 de HHDN, abreviatura para 1,2,3,4,10,10-

-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-1,4,5,8-endo-exo-dimetanonaftaleno. Es un endo-exo esteroisómero de isodrin y es un producto intermedio en la producción de dieldrin (figura 6).

DIELDRIN.

Es el nombre común para el insecticida técnico que contiene al menos 85 por 100 de HEOD, abreviatura de 1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4,5,8-endo-exo-dimetanonaftaleno. El dieldrin es el epóxido del aldrin y es el endo-exo esteroisómero del endrin (figura 6).

ENDRIN.

Es el nombre común para un insecticida técnico que contiene al menos 92 por 100 del esteroisómero endo-endo del dieldrin: 1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4,5,8-endo-endo-dimetanonaftaleno. El endrin es el epóxido de isodrin (figura 6).

p.p'-DDT.

Aunque el DDT fué sintetizado por Zeidler en 1874, sus propiedades como insecticida fueron descubiertas por Müller en 1939. El nombre de DDT deriva de su primera designación química: p.p'-dicloro-difenil-tricloroetano. El nombre correcto es el de 2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano (figura 6).

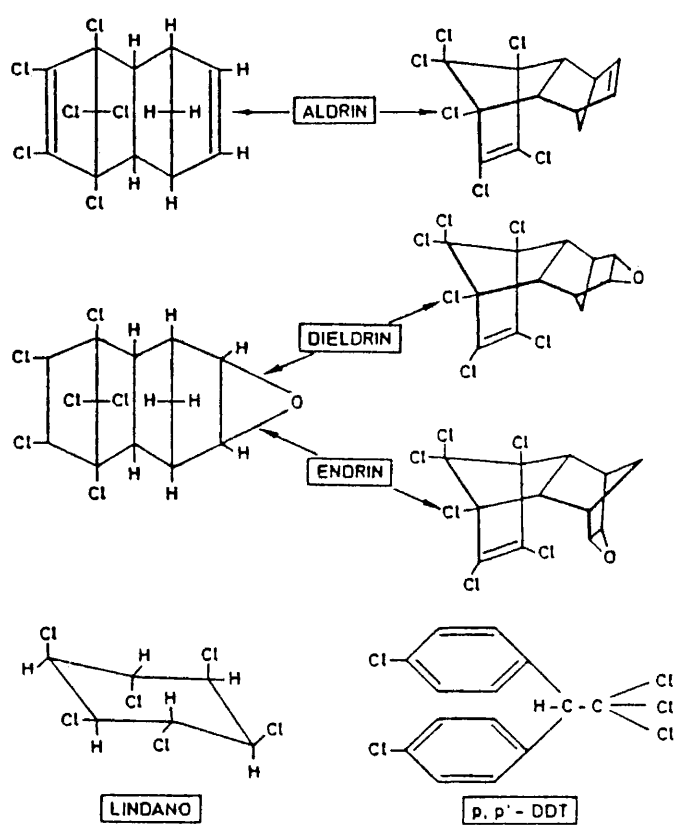


Figura 6 - Insecticidas organoclorados usados en el presente trabajo.

LINDANO.

Este compuesto fue preparado por Faraday en 1825 y hasta 1940 no se conocieron sus propiedades insecticidas. Se prepara por cloración del benceno en presencia de la luz solar. El producto crudo es una mezcla de isómeros. El isómero γ (γ -1,2,3,4,5,6-hexa clorociclohexano) o lindano es el más tóxico de todos (figura 6).

SOLOWAY (1965) ha estudiado la acción insecticida de numerosos compuestos ciclodienicos, encontrando una alta actividad solamente, en aquellos compuestos que contienen dos centros electronegativos situados en el plano de simetría que define el puente metilénico. Un centro electronegativo corresponde a la parte hexa-clorada de la molécula y el segundo centro electronegativo a un átomo de oxígeno y/o cloro. Todos estos insecticidas tienen efectos sobre el sistema nervioso central. Sin embargo, como los sitios ricos en electrones no se consideran sitios químicamente activos (BENSON, 1969), SOLOWAY supone que son lugares para probables interacciones electrostáticas. Por ello parece que más que reacciones químicas, suceden interacciones físicas entre los centros electro-negativos de los insecticidas y el centro activo biológico, posiblemente sobre la membrana de la célula nerviosa, pero solamente, cuando ocurre un acoplamiento útil de los dos determinado por el contorno crítico de la molécula. Además sugiere este autor que los epóxidos son los compuestos activos, mostrando también actividad insecticida aquellos otros compuestos capaces de ser realmente epoxidados. La casi rígida configuración de estos insecticidas, so

lubles en lípidos, es importante para el paso de estas sustancias a través de las membranas y para su acción molecular (HATHWAY, 1965).

Con respecto al grupo del DDT, una máxima actividad de la molécula, exige que esté sustituida en las posiciones -p,p'- por un halógeno o una cadena corta de grupos alquilo o alcoxi. La naturaleza de los sustituyentes para la otra mitad del etano es también crítica y esta parte de la molécula necesita tener una óptima afinidad frente a una hipotética proteína receptora. Esto se expresa por el siguiente orden de actividad: $-\text{CCl}_3 > -\text{CHCl}_2 > -\text{CH}(\text{NO}_2)\text{CH}_3 > -\text{C}(\text{CH}_3)_3$. Los sustituyentes sobre el carbono en α no solamente afectan la configuración óptima de la molécula sino también su detoxicación.

En relación con lo anteriormente expuesto, hay que tener en cuenta, que la dinámica bioquímica de los compuestos organoclorados, como la de cualquier otro tipo de compuestos xenobióticos, será una resultante de su penetrabilidad a través de las membranas biológicas, de la naturaleza de las interferencias que provoque y las respuestas que determine en los seres vivos y de su susceptibilidad al ataque de los sistemas enzimáticos de que aquellos disponen. Ninguno de estos aspectos se encuentra hasta el momento, lo suficientemente pormenorizado como para permitir unas generalizaciones convincentes en torno al problema de las correlaciones: estructura química-actividad biológica-biodegradabilidad.

1.5.2. INFLUENCIA DE INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS EN EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS.

Ya hemos señalado la influencia que los compuestos xenobióticos en general, pueden ejercer sobre las transformaciones de los constituyentes celulares a través de su efecto sobre las reacciones enzimáticas responsables del metabolismo. Esta influencia se refleja principalmente en un aumento o disminución de la síntesis de enzimas o bien en su efecto positivo o negativo sobre la actividad de las enzimas existentes, como respuesta de los organismos a las modificaciones del medio ambiente, es decir, lo que se conoce como regulación metabólica. Fenómenos de este tipo se han descrito para el metabolismo de carbohidratos de mamíferos sometidos a tratamiento con insecticidas organoclorados.

Los fenómenos toxicológicos asociados a la ingestión de insecticidas organoclorados permanecen actualmente como un tópico de vivo debate. Aunque los insecticidas organoclorados son aparentemente tóxicos por sus efectos sobre el sistema nervioso, hay evidencia de que también interfieren con varios procesos metabólicos en animales.

En relación con el metabolismo de carbohidratos, TINSLEY (1964), encuentra que la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en ratas, disminuye cuando el insecticida organoclorado DDT se adiciona a la dieta de estos animales.

PLAPP (1970) ha señalado la existencia de variaciones sig

nificativas en el metabolismo de la glucosa, que confieren cierta resistencia en la mosca (*Musca domestica* L.) frente a insecticidas organoclorados. Este autor determina las actividades de dos enzimas del ciclo de las pentosas fosfato (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa), concluyendo que el tratamiento con DDT y dieldrín estimula el metabolismo de la glucosa, siendo su efecto más acusado en la vía de las pentosas. En el caso del DDT estos resultados confirman los estudios realizados por SILVA (1959) y AGOSIN (1966), en los que se muestra que existe un incremento por la presencia de DDT en la utilización de glucosa en insectos y estos les hace sugerir que los cambios en la capacidad para metabolizar glucosa puede constituir un factor importante en la resistencia de los insectos frente a insecticidas organoclorados.

BHATIA y col., (1971; 1972 a), demuestran como resultado de un estudio sobre efectos metabólicos producidos por la administración de dieldrín a ratas, alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lo que se refleja por hiperglucemia, acidemia láctica, bajada de la tolerancia a glucosa y una elevada concentración en el plasma de ácidos grasos no esterificados. Asimismo, BHATIA (1972 b), ha estudiado el efecto del dieldrín sobre los sistemas enzimáticos de fosforilación de glucosa y algunas deshidrogenasas de ácidos orgánicos a nivel de síntesis de enzima, así como el efecto del dieldrín sobre el metabolismo lipídico en relación con la glucosa, demostrando que este insecticida induce la acumulación de triglicéridos en el hígado, procediendo el glicerol de la glu-

cosa utilizada.

Siguiendo en la línea de los estudios previamente mencionados, e intentando profundizar en el mecanismo de actuación de insecticidas organoclorados, BHATIA y col. (1973) investigan el efecto del dieldrín sobre el metabolismo de carbohidratos, centrándolo en el metabolismo del glucógeno. El glucógeno hepático es un carbohidrato de reserva que es muy susceptible a la influencia hormonal. Además, ya que la toxicidad del dieldrín incrementa la concentración en el plasma de ácidos grasos no esterificados y puesto que los ácidos grasos se sabe que influyen en el destino de la glucosa, por estimulación de su síntesis a partir de fuentes diferentes a los carbohidratos (WIELAND y col., 1970), consideraron de interés, examinar la contribución de la vía gluconeogénica en relación con la concentración de glucógeno hepático en ratas tratadas con dieldrín. Un aumento en el glucógeno hepático en animales tratados con dieldrín podría ser debido, a un aumento de la velocidad de biosíntesis de glucógeno (glucogenogénesis) y/o un decrecimiento de su catabolismo (glucogenolisis).

Los resultados de BHATIA y col. (1973), demuestran que la capacidad glucogenogénica de las ratas está fuertemente aumentada por la presencia de dieldrín, demostrado por el incremento de incorporación de ($U-^{14}C$) glucosa en el glucógeno hepático. Según estos autores, este hecho puede ser explicado de la siguiente manera: "la biosíntesis de glucógeno en el hígado y otros tejidos se realiza a través de una reacción catalizada por glucógeno sinteta-

sa. MERSMANN y SEGAL (1967), han comprobado que la regulación de la actividad de la glucógeno sintetasa y consecuentemente la síntesis del glucógeno en hígado tiene lugar por interconversión de la forma "D" (dependiente de glucosa-6-fosfato) y de la forma independiente "I" de la enzima. Habiendo observado un aumento de la actividad de la forma "I" de la glucógeno sintetasa, consideran que puede ser esta la causa que contribuye a elevar el contenido de glucógeno en el hígado por la presencia de dieldrín. Además, la conversión de la forma "D" en la "I", puede ser potenciada por glucosa-6-fosfato y glucosa debido a la elevada concentración de este azúcar en la sangre por la presencia de dieldrín, de donde la puede tomar el hígado libremente favoreciendo el paso de la forma "D" a la "I" de la mencionada glucógeno sintetasa. De acuerdo con estos resultados GRANT Y MEHRLE (1973), han descrito una inhibición de la movilización del glucógeno hepático en peces por bajas dosis de endrín y un bloqueo total a dosis altas.

BHATIA y col. (1973), también han estudiado el efecto del dieldrín sobre la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, encontrando que se produce una inhibición de la actividad de esta enzima por la presencia de dieldrín, dejando así más glucosa-6-fosfato sin transformar. Estudios sobre el efecto "in vivo" de una concentración subletal de endrín parecen indicar que la glucosa-6-fosfatasa disminuye en el pez *Ophiocephalus punctatus*, aunque los resultados no son significativos (SASTRY y SHARMA, 1978).

Los resultados obtenidos por los autores anteriormente

mencionados, junto con los obtenidos por ONIENKO (1966), quien observa una disminución de fosforilasa en hígado y riñón de ratas sometidas a dieldrín, lleva a concluir, que los altos niveles de glucógeno encontrados durante el tratamiento con dieldrín, pueden ser el resultado de un decrecimiento de la velocidad de degradación de glucógeno acoplado con un incremento en la síntesis de este polisacárido.

También en relación con el metabolismo glucídico KACEW y SINGHAL (1973), han encontrado en ratas, respuestas adaptativas del metabolismo hepático de carbohidratos, por la administración oral de p,p'-DDT. Las enzimas de la gluconeogénesis, piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa, fructosabifosfatasa y glucosa-6-fosfatasa se inducen bajo el tratamiento con este compuesto organoclorado, resultados que están de acuerdo con los encontrados por BAHTIA y col. (1973). Así mismo, KACEW y SINGHAL (1973) encuentran efectos de disminución de presión sanguínea, del pH de la sangre y una elevación de alanina en el tejido cerebral.

Estos mismos autores (1974,1976) encuentran en ratas tratadas por vía oral con los insecticidas p,p'-DDT, endrín, heptacloro, y α -clordano, que los aumentos en las actividades de las enzimas gluconeogénicas, anteriormente mencionadas obedecen a efectos de estos insecticidas sobre la síntesis de AMP cíclico, puesto que estos compuestos estimulan la actividad de la adenilato ciclasa en hígado y corteza renal. Así mismo encuentran hiperglucemia, glucosuria y uremia y disminución de glucógeno hepático en animales tra

tados. Por otra parte también observan una disminución de la proteína-quinasa nuclear dependiente de AMP cíclico. Estos resultados están de acuerdo en cuanto al incremento de las enzimas gluconeogénicas con los anteriormente citados de BHATIA y col. (1973), pero difieren en cuanto al contenido en glucógeno hepático. Podría interpretarse que la diferencia observada respecto al glucógeno, depende de efectos específicos peculiares de las moléculas orgánicas que constituyen los distintos insecticidas incluyendo las formas isómeras. La disminución de la proteína-quinasa nuclear está en concordancia con el efecto encontrado por clorofibrato en el insecto *Ceratitis capitata* (PRIEGO, 1977).

La influencia de insecticidas organoclorados se ha estudiado también en hígado de pollo, en orden a conocer su posible efecto sobre el metabolismo de carbohidratos en estos animales tratados con dietas que contienen distintas cantidades de insecticidas (SREBOCAN y col., 1978). Los resultados obtenidos indican variaciones, en contenido de glucosa, piruvato y las cuatro enzimas clave de la gluconeogénesis, que dependen del insecticida utilizado y la dosis administrada.

Todos estos datos parecen indicar que tiene lugar un descenso del flujo glicolítico debido al tratamiento con insecticidas organoclorados. Sin embargo experimentos realizados con hepatocitos de ratas mantenidas en ayuno 48 horas después de ser alimentadas con p,p'-DDT en la dieta (STORY y FREEDLAND, 1978), muestran que este insecticida inhibe la gluconeogénesis entre piruvato y PEP.

No obstante la diferencia en la actividad de PEPCK frente al control, aunque es significativa es muy escasa.

La inhibición de la glicolisis, en estas condiciones, no está del todo clara, puesto que se conoce muy poco acerca de la influencia de los mencionados insecticidas organoclorados sobre la síntesis y la actividad de las enzimas clave de esta ruta. Sin embargo, la acumulación de alanina indicada anteriormente, está en concordancia con esta inhibición, ya que es conocido el efecto inhibidor de la alanina sobre la enzima piruvatoquinasa. La acumulación de alanina podría explicarse por un descenso de los niveles de glutamato-piruvato transaminasa, como ocurre en el alga *Tetrahymena pyriformis*, tratada con hexaclorobenceno (GEIKE, 1978). En consecuencia el hecho de que ciertos autores sugieran una gluconeogénesis operativa a partir del piruvato resulta difícil de conciliar con el posible origen del piruvato a partir de la glucosa, pudiendo tener lugar una gluconeogénesis operativa a partir de aminoácidos que originan directa o indirectamente piruvato.

Por otra parte, se ha demostrado un efecto inhibidor de varios insecticidas organoclorados sobre la actividad hexoquinásica de levadura "in vitro" (SADAR y GUILBAULT, 1971). Entre los insecticidas examinados sólo cuatro compuestos inhiben esta enzima: aldrín, clordano, p,p'-DDT y heptacloro.

1.5.3.- INFLUENCIA DE INSECTICIDAS ORGANOCOLORADOS EN EL MEJILLON.

Los moluscos bivalvos presentan un gran interés para los estudios sobre contaminación, ya que son animales sedentarios que por su forma de alimentación acumulan fácilmente los contaminantes presentes en su medio ambiente. Dentro de los moluscos bivalvos reviste especial interés el mejillón, organismo generalmente muy contaminado, por lo que ha sido objeto de muchas investigaciones toxicológicas. Los principales contaminantes encontrados en mejillones y que de un modo u otro afectan su metabolismo y modo de vida en forma más o menos nociva son además de las bacterias y virus patógenos, los aceites minerales y detergentes, derivados halogenados de hidrocarburos (insecticidas organoclorados y bifenilos policlorados), metales y residuos radiactivos.

En algunos casos, el contenido en contaminantes del animal, refleja su concentración en el agua, en cuyo caso estos animales pueden ser utilizados como indicadores de la contaminación (FOSSATO y SIVIERO, 1974; MONOD, 1977; GOLDSBERG y col., 1978). El uso de mejillones adultos en estudios de toxicidad presenta sin embargo un problema: la rapidez con la que el animal cierra sus valvas, cuando es estimulado por cualquier sustancia extraña o por cualquier cambio nocivo en el ambiente (CRAPP, 1971). A pesar de esto, su naturaleza sedentaria y su rápida asimilación de insecticidas, así como su elevada capacidad para concentrar estos compuestos (SIMAL y col., 1971; ERNST, 1975) hace de los mejillones el material más adecuado para el control de la contaminación por insecticidas en el ambiente.

marino (BUTLER, 1971).

La presencia de insecticidas organoclorados ha sido detectada en tejidos de mejillones por diversos autores (ROBINSON y col., 1967; SIMAL y col., 1971; KOEHMAN y VAN GENDEREN, 1972; HIDAKA y col., 1972; BUTLER, 1973; BEDFORD y ZABIK, 1973; BOADO y col., 1975; EADES, 1975; AKMAN y col., 1976; GONCZI, 1978).

En lo que se refiere a la forma de captación de estos insecticidas del medio ambiente, por los moluscos bivalvos, los datos son muy discrepantes (BUTLER, 1971; BRODMAN, 1970; ROBERTS, 1972). Según ROBERTS (1972), el principal lugar de concentración parece ser el intestino y la glándula digestiva, por lo que sugiere que la concentración de tales compuestos en el mejillón, resulta principalmente de la ingestión de insecticidas con los alimentos. Sin embargo en otros casos, se ha encontrado que las gónadas almacenan el doble de DDT que la glándula digestiva (BUTLER, 1966), lo que hace sugerir a LOWE y col., (1971) que una disminución de estos residuos acumulados en moluscos bivalvos, puede ser debido a la freza.

Las primeras investigaciones sobre la toxicidad de insecticidas en moluscos bivalvos se realizaron en relación con las dosis letales (PORTMANN, 1968; PORTMANN, 1970). Posteriormente sin embargo, se ha obtenido también información sobre efectos crónicos de estos insecticidas. La presencia de bajos niveles de insecticidas organoclorados en moluscos bivalvos, afectaban a los movimientos de las conchas y velocidad de consumo de oxígeno, así como al peso

total del cuerpo (BUTLER, 1965; BUTLER, 1966; LOWE y col., 1971; BUTLER, 1971; ROBERTS, 1972), lo que puede ser debido a una reducción en la eficacia de la alimentación o a otros factores metabólicos, como los señalados por ENGEL y col. (1972) quienes sugieren que dosis subletales de insecticidas organoclorados pueden conducir en *Merccenaria mercenaria* a alteraciones metabólicas indicativas de un incremento de la degradación de glucosa con supresión de gluconeogénesis. La formación del bisco en *M. edulis* se reduce con el aumento de las concentraciones de los compuestos organoclorados, probablemente debido a una disminución de la actividad pedal, aunque es posible que haya algún tipo de interferencia directa con la síntesis o combinación de los diferentes componentes del bisco (ROBERTS, 1973).

Las dosis letales en larvas y su efecto en el desarrollo, también se han determinado para varios compuestos organoclorados en distintos bivalvos marinos (BUTLER, 1966; DAVIS, 1961; HIDU, 1969; UKELES, 1962). De los insecticidas examinados se encontró que el lindano era el menos tóxico para las larvas y huevos de bivalvos.

Resulta difícil comparar los datos existentes sobre mejillones y los efectos de su contaminación debido a que la mayoría son fragmentarios, pero pueden ser útiles para establecer futuros planes de estudio para la evaluación de los efectos de insecticidas organoclorados sobre los varios aspectos ya señalados como unión biscal, crecimiento, desarrollo de larvas, efectos metabólicos y también sería interesante considerar estos efectos a nivel no sólo de individuo sino de comunidad. La amplia distribución de

la familia *Mytilidae* y particularmente del género *Mytilus*, junto con su forma de vida epifaunal, sugiere que los mejillones pueden ser muy útiles para los mencionados estudios de contaminación.

1.6. OBJETO DEL TRABAJO.

El objeto del presente trabajo, como ya hemos indicado en la introducción, consiste en aportar una serie de datos experimentales encaminados a caracterizar la piruvatoquinasa de pie de mejillón como enzima clave del metabolismo glucídico en la encrucijada del PEP.

El enfoque de dicho estudio se basa en la inexistencia en la bibliografía consultada de datos concernientes al comportamiento de esta enzima en el órgano anteriormente descrito, lo que desde el punto de vista de investigación básica creemos puede constituir un aporte al conocimiento de la bioquímica muscular del mejillón.

En relación con esto, se ha abordado el estudio de aislamiento y purificación parcial de la mencionada piruvatoquinasa de pie de mejillón, así como de sus propiedades enzimáticas y de modulación por sustrato y efectores.

Una segunda parte de este trabajo, la constituye el estudio de la influencia de algunos insecticidas organoclorados más usuales sobre la actividad enzimática de la piruvatoquinasa de pie de mejillón, puesto que como ya hemos indicado, tanto la capacidad de contaminación de estos moluscos y en especial el mejillón, como los efectos tóxicos de los citados compuestos, permiten predecir una indudable influencia en su metabolismo.

Se investigó el efecto de aldrín, dieldrín, endrín, lindano y p,p'-DDT sobre la actividad enzimática "in vitro" de la piruvatoquinasa, determinando en el caso particular del dieldrín la naturaleza del efecto inhibitor, manifestado por este insecticida, con respecto al sustrato PEP, así como en presencia de efectores de esta enzima. Previamente se investigó la presencia de estos insecticidas en diversos órganos de mejillón.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. MATERIAL.

2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron mejillones (*Mytilus edulis* L.), adquiridos vivos en el mercado. En algunos experimentos en que se necesitaba una mayor cantidad, nos fueron proporcionados en el Mercado Central y provenían de una depuradora industrial de moluscos (nº1 de Aguiño) recolectados en las Rías Bajas (Pontevedra).

Los animales se mantenían a 4° C hasta el momento de su utilización, durante un período de tiempo que en la mayor parte de los casos no excedió de 24 horas.

2.1.2. PRODUCTOS UTILIZADOS.

A lo largo del presente trabajo se utilizaron productos químicos, calidad reactivo de análisis, de la firma comercial Merck. Los productos bioquímicos procedían de Sigma Chemical Company (St. Louis Mo., USA) y de Boehringer Mannheim.

Los insecticidas organoclorados eran suministrados por Polyscience Corporation Chemical division. Analytical Standards, distribuido en España por Chemicontrol. En todos los compuestos la pureza es de 99 - 100 %.

2.1.3. APARATOS UTILIZADOS.

Las pesadas se realizaron en balanza analítica Sartorius y en granatario Stanton D. 50. T.

Para las mediciones de pH se utilizó un pH-metro Metrohm -Herisau E-512.

Los homogeneizados se obtuvieron en homogeneizador eléctrico Braun y en homogeneizador de cuchillas Aid-309.

La centrifugación de las preparaciones enzimáticas se llevaron a cabo en centrífuga refrigerada Janetzki K-24.

Las determinaciones colorimétricas se efectuaron en un Spectronic-70 Bausch G. Lomb.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en espectrofotómetro Shimadzu UV-200 y en espectrofotómetro Pye-Unican

SP8-100.

Para las incubaciones se utilizó un baño con agitación Selecta-Unitronic-320.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron con un sistema Pleuger con fuente de alimentación Pleuger, manteniendo constante el amperaje.

Las cromatografías en columnas se llevaron a cabo, utilizando un colector de fracciones automático de pesos, Shandon Southern SAD 2405.

Los gradientes salinos empleados en la elución de columnas cromatográficas, se consiguieron con un mezclador de soluciones que consta de dos depósitos de 250 ml. de capacidad cada uno y comunicados entre sí de Pharmacia Chemical Upsala.

Para la determinación cromatográfica de insecticidas se utilizaron cromatógrafos Perkin-Elmer F-11 y Hewlett-Packard 5753 G. Los aparatos estaban provistos de detectores de captura electrónica.

Todas las operaciones que lo requerían se realizaron en cámara fría y a una temperatura de 0 - 4°C.

2.2. MÉTODOS.

2.2.1. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS.

Pie, manto y hepatopáncreas de mejillón, material biológico utilizado en el presente trabajo, fueron pesados y troceados antes de su homogeneización. El pie, tejido más duro, se trituró previamente en homogeneizador de cuchillas. Para la homogeneización de los órganos se utiliza un volumen de Tris-HCl 50 mM. pH 7,5 conteniendo EDTA 1 mM, que es siempre cuatro veces el peso de tejido fresco. Todas las operaciones se realizaron a baja temperatura (0-4°C).

Los homogeneizados resultantes de los tres órganos se centrifugaron a 16.000 x g durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes correspondientes al manto y hepatopáncreas se filtraron a través de papel Watman previamente humedecido con el tampón de extracción, a fin de liberarlos de restos lipídicos.

Los correspondientes extractos así obtenidos, se usaron para la determinación de la actividad enzimática.

2.2.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

La actividad de la piruvatoquinasa se determina de acuerdo con el método de BUCHER y PFLEIDERER (1955), midiendo el piruvato formado a partir de fosfoenolpiruvato, por acoplamiento del sistema con un exceso de lactato deshidrogenasa en presencia de NADH, según el siguiente esquema de reacción:



La mezcla de reacción contiene en un volumen final de 3 ml.: Tris-HCl 30 mM, pH 7,5; KCl 75 mM; MgCl₂ 8 mM; NADH 0,18 mM; 18 UI de LDH y concentraciones de ADP, PEP y otros reactivos, como se indica en cada caso.

La reacción se comienza por edición de PEP y se mide la variación de absorbancia a 340 nm. y a temperatura ambiente. Los cambios en la absorbancia se miden durante los cinco minutos siguientes al comienzo de la reacción, en los que la variación es lineal con el tiempo. Las cubetas utilizadas en todas las medidas fueron de cuarzo y de 1 cm. de paso óptico.

Unidad de actividad enzimática.

La unidad de actividad enzimática (unidad internacional) para la piruvatoquinasa, se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un μ mol de sustrato por minuto, medido por el consumo de NADH, debido al piruvato formado en presencia de lactato deshidrogenasa. El coeficiente de extinción molar para NADH a 340 nm. es de $6,22 \times 10^3$ (HORECKER y KORNBERG, 1948).

Actividad específica.

Se define la actividad específica como el número de unidades de actividad enzimática por milígramo de proteína.

2.2.3. VALORACION DE PROTEINAS.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó según el método de LOWRY y col., (1951):

Fundamento: el método se basa en la combinación de dos reacciones, una de las cuales es la reacción del biuret y otra la reducción del reactivo fosfotungstico molíbdico (reactivo Folin-Ciocalteu) por la tirosina y el triftófano presentes en la proteína.

Reactivos: Solución A, preparada extemporáneamente a partir de las soluciones a, b y c que se indican a continuación y en proporción 98:1:1 (v/v/v).

Solución a: Na_2CO_3 al 3% (p/v) en NaOH 0,1 N.

Solución b: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 2% (p/v).

Solución c: Tartrato Sódico-potásico al 1% (p/v).

Solución B: Reactivo de Folin Ciocalteu diluido 1:2.

Procedimiento: En todas las determinaciones se utilizaron como patrones, volúmenes de solución de seroalbúmina bovina conteniendo 50, 100, 150 y 200 μg por tubo y completando en agua destilada hasta un volumen de 1 ml. Volúmenes de extracto contien

do cantidades adecuadas de proteína con el fin de obtener lecturas dentro de la zona óptima de absorbancia, se llevan igualmente a un volumen de 1 ml.

A todas las muestras así preparadas se añade 5 ml. de solución A. Se agita y se deja reposar 20 min. a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añade a cada tubo 0,5 ml. de solución B, se agita y se deja reposar 20 min. al cabo de los cuales se realiza la medida de absorbancia a 660 nm., frente a un blanco en el que el volumen de muestra o patrón ha sido sustituido por agua destilada.

Previamente a las determinaciones de proteínas realizadas en el presente trabajo, se comprobó la bondad del método confeccionando una curva patrón, para distintas concentraciones de albúmina de suero bovino.

Cuando la piruvatoquinasa tiene un grado más alto de pureza, la concentración de proteínas se determina por lectura directa de la absorbancia de las muestras a 280 nm. (NEILANDS y STUMPF, 1955).

2.2.4. PRECIPITACION FRACCIONADA CON SULFATO AMONICO.

El extracto enzimático crudo preparado según se indicó en el apartado 2.2.1., se lleva a una saturación del 30 por 100 con sulfato amónico finamente pulverizado (176 g/l). La adición del sulfato amónico se realiza en un período de 1 hora, con agitación magnética y a una temperatura de 4°C. Tras separar el precipitado por cen-

trifugación a 16.000 x g durante 30 min. a 4°C, el sobrenadante se lleva a 60 por 100 de saturación por nueva adición de sulfato amónico (198 g/l) en las condiciones ya mencionadas. La suspensión obtenida se centrifuga a 16.000 x g durante 30 min. a 4°C.

2.2.5. DIALISIS.

El sedimento procedente de la última centrifugación se disuelve en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 conteniendo EDTA 1mM y 2-mercaptoetanol 6 mM y se dializa frente a EDTA 1,35 mM durante una hora al cabo de la cual se cambia la concentración de EDTA a 0,27 mM y se dializa durante toda la noche (12 horas). Esta operación se ha realizado como se ha indicado para las otras operaciones, a la temperatura de 4°C.

2.2.6. ESTABILIDAD DE LA ENZIMA.

La piruvatoquinasa de pie de mejillón manifiesta una pérdida de actividad, cuando los extractos se preparan utilizando como medio de homogeneización Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 conteniendo EDTA 1 mM, lo cual nos llevó a realizar unos experimentos con el fin de observar si la presencia de glicerol (30%) y 2-mercaptoetanol en concentraciones de 3 mM y 6 mM, actuaban de forma positiva manteniendo por un período más largo de tiempo su actividad. Conocido el efecto que la temperatura puede ejercer sobre la estabilidad enzimática se probó el efecto de dichos compuestos químicos a distintas temperaturas: 0°C, 4°C y 20°C.

Los extractos enzimáticos junto con el compuesto seleccionado se mantenían en tubos a la temperatura fijada y de ellos se tomaban alícuotas para la determinación de la actividad enzimática. Cuando los extractos enzimáticos se mantenían congelados, con el fin de evitar alteraciones estructurales por congelado y descongelado, se pusieron tantos tubos que contenían la solución enzimática en el medio seleccionado, como medidas a realizar.

2.2.7. PROPIEDADES ENZIMATICAS.

Actividad de la enzima respecto al pH.

Las condiciones de ensayo son las ya descritas en el apartado de determinación de la actividad enzimática. El pH del medio se varió con la utilización de diferentes tampones y a fin de obtener un mayor margen de pH se utilizaron en este experimento cuatro tampones diferentes:

- 1.- Tampón Glicina, para la zona de pH de 12,5 - 9
- 2.- Tampón Tris-HCl para la zona de pH de 9 - 7,5
- 3.- Tampón Tris-Maleato para la zona de pH de 7,5 - 5,5
- 4.- Tampón Acetato para la zona de pH de 5,5 - 4

Todas las medidas se realizaron tres veces, utilizándose en la representación de los resultados el valor medio.

Estabilidad de la enzima respecto al pH.

Una vez conocido por el experimento anterior el pH óptimo de la piruvatoquinasa de pie de mejillón se investigó la estabilidad de la enzima durante 15 min. a 37°C a diferentes valores de pH. Los tampones utilizados fueron los mismos que en la experiencia anterior.

Muestras conteniendo extracto enzimático de piruvatoquinasa de pie de mejillón a diferentes valores de pH, se mantienen a 37°C durante 15 min. Pasado este tiempo se colocan los tubos en baño de hielo y se toman alicuotas en las que se determina la actividad residual en las condiciones de ensayo señaladas. Las actividades así obtenidas para las diferentes muestras se refieren a la actividad de una muestra medida inmediatamente después de la preparación del extracto enzimático (sin tratamiento previo), considerando ésta, como el 100 por 100 de actividad. Los valores así obtenidos se representan frente al pH.

Estabilidad de la enzima respecto a la temperatura.

Muestras conteniendo piruvatoquinasa de pie de mejillón en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM se mantuvieron a diferentes temperaturas durante 5 min. Pasado este tiempo se colocan los tubos en baño de hielo y se toman alicuotas en las que se determina la actividad en las condiciones de ensayo descritas.

Para las representaciones gráficas de los valores de actividad obtenidos en función de la temperatura, se considera como el 100 por 100 la actividad de una muestra, valorada inmediatamente después de la preparación del extracto enzimático.

Actividad de la enzima respecto a la temperatura.

Se utilizan las condiciones de ensayo ya descritas, variando la temperatura de la mezcla de reacción. La actividad enzimática en cada ensayo, como logaritmo de la velocidad de reacción se representa frente a inversas de temperatura absoluta.

Cálculo de la energía de activación.

Se basa en la ecuación de Arrhenius, acerca del efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones químicas:

$$k = A e^{-E/RT}$$

También se puede escribir la ecuación de Arrhenius en forma logarítmica como:

$$\ln k = \ln A - \frac{E}{RT}$$

en la cual se muestra que el \ln de la cte de velocidad es una función lineal de la inversa de la temperatura absoluta. También la podemos expresar como:

$$\log k = \log A - \frac{E}{2,303 R} \cdot \frac{1}{T}$$

ecuación que corresponde a la de una línea recta que se obtiene representando gráficamente $\log k$ en función de $1/T$ (representación de Arrhenius).

En el caso de reacciones enzimáticas es posible la estimación del valor de E (energía de activación), al representar $\log v_{\max}$ en función de $1/T$, ya que los valores de las velocidades iniciales de reacción son proporcionales a la cte de velocidad " k ", cuando la reacción se hace a concentraciones saturantes de sustrato. En cuanto a valores de T se utilizan aquellos en los que la enzima no sufre desnaturalización, en nuestro caso los correspondientes a 20, 30 y 35°C.

Cálculo del coeficiente de temperatura Q_{10}

El coeficiente de temperatura Q_{10} (establecido por Vant' Hoff), es un factor que expresa el aumento de la velocidad de reacción con los sucesivos incrementos en 10°C en la temperatura. Q_{10} es por tanto, la relación entre las velocidades de reacción a $T^\circ\text{C}$ y a $T+10^\circ\text{C}$.

Los valores de Q_{10} difieren bastante según el intervalo de temperaturas que se considere; sus valores límites para reacciones catalizadas por enzimas son de 1,1 y 5,3.

Actividad residual a la temperatura de semiinactivación en función del tiempo.

La temperatura a la cual la enzima pierde la mitad de su actividad, podemos calcularla a partir de los experimentos realizados para calcular el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima. A esta temperatura (57°C), muestras conteniendo piruvatoquinasa de pie de mejillón, en solución tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM se mantienen durante varios períodos de tiempo, al cabo de los cuales se coloca cada tubo en un baño de hielo y se toman alícuotas en las que se determina la actividad residual.

Para las representaciones gráficas de los valores de actividad obtenidos en función del tiempo, se considera la actividad de una muestra sin tratamiento previo como el 100 por 100.

2.2.8. PARAMETROS CINETICOS

Coefficiente de Hill.

Hill (1910) trató de explicar la curva de unión de O_2 a la hemoglobina con ayuda de un modelo matemático. Considera que las constantes de unión del O_2 a la hemoglobina son progresivamente mayores a medida que se unen las moléculas de oxígeno. Su ecuación:

$$\log \frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = n \log(O_2) - \log k$$

se puede aplicar a enzimas con cinética cooperativa si la velocidad (v) se supone proporcional a la saturación parcial \bar{Y} , como sugiere MONOD y col., (1963). Así su ecuación se transforma en:

$$\log \frac{v}{V - v} = n \log S - \log k$$

La representación de \log de $v/V-v$ frente a \log de S , se usa a menudo para demostrar cinéticas cooperativas de enzimas.

En el caso de cooperatividad infinita, los datos experimentales se adaptarán bien a la relación, ya que "n", el número total de sitios involucrados, es igual al número de lugares interactuantes experimentalmente observados (BERNHARD, 1968). Pero la pendiente de la representación de Hill nunca da el valor de "n" (número de protóme-

ros en el oligómero), se sabe que la hemoglobina es un tetrámero y el valor de "n" obtenido varía de 2,5 - 3. Así según va disminuyendo el grado de cooperatividad a una situación más real, el ajuste de los puntos experimentales a una línea recta será menos bueno. En estos casos la pendiente máxima de la representación de Hill se designa por "h" (coeficiente de Hill) que nos da una indicación de la cooperatividad del sistema y mide la estequiometría aparente del proceso de unión en el punto más cooperativo.

El punto donde $\log v/V-v$ es igual a cero, aunque no es una constante verdadera, tiene importancia porque es donde $v = 1/2 V$ y entonces se puede definir como $K_{SO,5}$ (la concentración de sustrato necesaria para dar $1/2 V$).

PURICH y FROMM (1972), han señalado que aunque la ecuación de Hill en la forma anteriormente expresada, se puede usar para sistemas de un solo sustrato, deben tomarse precauciones cuando se estudian sistemas multisustratos. El coeficiente de Hill con todas sus limitaciones, tiene la virtud de que usado convenientemente da a los investigadores alguna luz en cuanto a si un sistema es o no cooperativo.

La ecuación de Hill puede también usarse para representar datos obtenidos con efectores negativos, cuando la concentración de sustrato se mantiene constante a un nivel saturante y se varía la concentración del inhibidor. La ecuación sería:

$$\log \frac{v}{V-v} = \log k' - n' \log I$$

Valor de R_s .

Experimentalmente el comportamiento hiperbólico (cinética de Michaelis) o sigmoidal de una enzima se puede distinguir estableciendo la razón entre la concentración de sustrato necesaria para adquirir una velocidad 0,9 de la velocidad máxima, con la concentración de sustrato necesaria para adquirir una velocidad 0,1 de la velocidad máxima. Esta relación llama R_s mide la cooperatividad de la interacción.

Para las enzimas que siguen cinéticas hiperbólicas el valor de R_s es de 81, independientemente del valor de la K_m o de la velocidad máxima. Para los sistemas con comportamiento sigmoidal, el valor de R_s es menor de 81. En presencia de efectores alostéricos, un valor de $R_s > 81$ indica generalmente activación alostérica y un valor de R_s menor que 81 indica inhibición alostérica.

2.2.9. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-150.

Se utilizó Sephadex G-150, con un intervalo de fraccionamiento para proteínas globulares con pesos moleculares comprendidos entre 5.000 y 400.000.

Tratamiento del gel.

El gel se mantuvo durante tres días en un exceso de solu

ción tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 1mM y mercaptoetanol 6 mM, a la temperatura ambiente, para conseguir un perfecto hinchado de los granos de gel. Durante este proceso se agitó el gel suavemente con objeto de no alterar los granos y a continuación se desgasificó a vacío para evitar que las burbujas de gas que pudieran quedar atrapadas entre los granos de gel, produzcan un flujo desigual cuando éste se coloca en el tubo de vidrio.

Preparación de la columna.

Se utilizó como soporte del gel un tubo de vidrio de 2,5 cm. de diámetro interno y 60 cm de longitud, cerrado en uno de sus extremos con vidrio poroso que sirve de soporte al lecho de gel y sobre el que se coloca una fina capa de algodón para evitar que éste, tape los poros del vidrio. Sobre el tubo de vidrio colocado verticalmente se añade el gel, dejándolo caer suavemente por las paredes y con ayuda de una jeringa se dejan completamente llenos de eluyente los espacios muertos, y sin burbujas de aire. Para estabilizar y equilibrar el lecho de gel, se pasa a través de él, un volumen de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM, equivalente a dos o tres veces el volumen ocupado por el gel.

TABLA I.- PARAMETROS OPERATORIOS UTILIZADOS EN LAS CROMATOGRAFIAS CON SEPHADEX G-150 Y DEAE-SEPHADEX A-50.

| Fase estacionaria | Volumen de lecho (ml.) | Carga | Velocidad de flujo (ml/h.) |
|--------------------|------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| Sephadex G-150 | 147 | 0,3 mg/ml. de gel | 15 |
| DEAE-Sephadex A-50 | 138 | eluato cromatografía Sephadex G-150 | 15 |

Aplicación de la muestra.

Un volumen conocido del sobrenadante del dializado, se aplica a la columna. Para cargar la muestra, una vez desconectado el recipiente con el eluyente usado para estabilizar y equilibrar el lecho de gel, y eliminado el que pueda quedar en su superficie, se cierra la salida de la columna y se deposita con cuidado la muestra sobre el gel. Se abre entonces la salida de la columna y cuando la muestra ha penetrado en el interior del gel, se cubre el eluyente y se conecta con el tampón de elución Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM. La muestra aplicada no sobrepasó en ningún experimento de 0,5 mg de proteína por ml de gel.

Elución.

Se realizó con el mismo tampón de equilibrado a un flujo de 15 ml/h. recogiendo fracciones de eluido de 2,5 ml., en las que se determina la actividad de la piruvatoquinasa en la forma ya indicada y se valoran proteínas mediante la medida de la absorbancia de estas mismas fracciones de eluido a 280 nm. en espectrofotómetro, con cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

2.2.10. CROMATOGRAFIA DE DEAE-SEPHADEX A-50.

En el tratamiento del gel, preparación de las columnas y aplicación de la muestra se siguió el mismo procedimiento y se observaron las mismas precauciones indicadas para la cromatografía anterior. Los parámetros operatorios utilizados en ambos tipos de cromatografías se pueden ver en la tabla I.

Las fracciones con actividad, eluidas de la anterior cromatografía en Sephadex G-150, se aplican directamente a la columna de DEAE-Sephadex A-50 y se pasan 300 ml. de solución de equilibrado, aplicando después un gradiente lineal formado por:

Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM y 2-mercap
toetanol 6 mM, y

Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM y 2-mercap
toetanol 6 mM y KCl 1M.

En las fracciones de eluido se determina la actividad de la piruvatoquinasa y se valoran proteínas por lectura directa a 280 nm.

2.2.11. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Preparación de los geles.

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó según el método descrito por DAVIS (1964). Se usan dos tipos de geles. El gel de acumulación cuya misión es conectar la proteína si la disolución está muy diluida o no es pura y el gel de separación donde se realiza la separación de la proteína.

Preparación del gel de separación.

Se parte de las siguientes soluciones:

A: TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina) 0,23% (v/v) en tampón Tris-HCl 3 M., pH 8,9.

B: Acrilamida 30% (p/v), N,N'-metilen-bis-acrilamida 0,75% (p/v) en agua destilada. La solución se filtra sobre papel.

C: Persulfato amónico 0,14% (p/v) en agua destilada. La solución se prepara en el momento de su utilización.

El gel inferior de separación es de 7,5% de acrilamida.

Para su formación se mezclan en proporción 1:2:3:4 (v/v/v/v) las soluciones A:B:C:agua destilada. La mezcla se desgasifica a vacío, se introduce en los tubos, cuyo extremo inferior está cerrado mediante un soporte que sirve para su colocación vertical y se llenan todos con el mismo volumen de la mezcla de soluciones. Para evitar la formación de menisco se cubren todos los tubos con una pequeña capa de agua. Para la realización de la fotopolimerización se colocan los tubos frente a un tubo fluorescente durante una hora, cuando esta se ha realizado completamente se vierte el agua que cubría los geles y se procede a la formación del gel superior.

Preparación del gel de acumulación.

Se parte de las siguientes soluciones:

D: TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilen-diamina) 0,46% (v/v) en tampón Tris-HCl 0,5 M., pH 6,7.

E: Acrilamida 10% (p/v), N,N'-metilen-bis-acrilamida 2,5% (p/v) en agua destilada. La solución se filtra sobre papel.

F: Riboflavina al 4% (p/v) en agua destilada.

Para la formación del gel superior (de acumulación), se mezclan en proporciones 1:2:3:4 (v/v/v/v) las soluciones D:E:F:agua destilada. La mezcla se desgasifica a vacío y se añade 1 ml. sobre cada tubo que contiene el gel inferior y se cubre igualmente con una pequeña capa de agua para evitar la formación de menisco. Realizada la fotopolimerización se retira el agua que cubría los geles.

Aplicación de la muestra.

La cantidad de muestra aplicada a cada tubo depende del número de proteínas presentes. Un rango práctico para muestras con solamente unos pocos componentes es de 1-20 μ g, mientras que se pueden aplicar por encima de 200 μ g de una muestra cruda. En todos nuestros experimentos hemos usado estas cantidades, sin sobrepasarlas. A la muestra se le añadió glicerol para evitar su disolución posterior con el tampón en la cámara de electroforesis.

Desarrollo electroforético.

Se colocan los tubos conteniendo los geles y la muestra ya aplicada, en la cubeta de electroforesis y se llenan las cámaras superior e inferior con solución tampón Tris-glicina, pH 8.3 . A la solución tampón en la cámara superior se añade 1 ml. de bromofenol 0,001% (p/v) como referencia de migración. La electroforesis se lleva a cabo en cámara fría (2°C) y se hace circular una corriente de 2-3 mA por tubo. La electroforesis finaliza cuando el frente azulado de bromofenol está localizado a unos 0,5 cm. del extremo final del gel separador. El proceso dura aproximadamente 2 horas al cabo de las cuales las columnas de gel se extraen de los tubos que las contienen, pasando la punta fina de una aguja de inyección alrededor de ellos e inyectando cuidadosamente agua a presión entre la pared del vidrio y del gel, empujando simultaneamente el gel hacia fuera.

Localización de la actividad de la piruvatoquinasa.

Una vez separadas las enzimas lo más importante es su localización en el gel de poliacrilamida. La estabilidad de la enzima debe ser mantenida durante la electroforesis y es igualmente importante que la actividad enzimática se valore rápidamente, antes de la difusión de los componentes separados. En los casos en que la enzima pueda ser congelada, sin pérdida de actividad, el gel puede

ser congelado durante un período de tiempo. En nuestros experimentos hemos valorado la actividad enzimática inmediatamente después del desarrollo electroforético.

De los varios métodos que se pueden emplear para la localización de enzimas en los geles de separación, para la localización de la piruvatoquinasa se siguió el procedimiento mencionado por OTHMAR GABRIEL (1971). Una vez sacados los geles del tubo, se colocan sobre un portaobjetos de vidrio colocado sobre una regla. Con una cuchilla se corta el gel en rodajas de 2,5 mm. lo más exactamente posible. Cada rodaja se coloca en un tubo de ensayo y con la ayuda de una varilla de vidrio maciza, se tritura la rodaja presionándola sobre las paredes del tubo. Al triturado conseguido de esta manera se añade un volumen conocido de solución tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM y se deja estar 1 hora a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo se determinó la actividad de la piruvatoquinasa en los macerados así obtenidos y previamente filtrados por medio de una pipeta Pasteur, cuyo extremo capilar se había recubierto con filtros de algodón empapados de la solución tampón.

2.2.12. EXPLORACION DE LOS NIVELES DE INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS
EN MEJILLON POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO.

Se realizaron análisis cromatográficos para la determinación cualitativa y cuantitativa de la posible presencia de insecticidas organoclorados en el mejillón y más específicamente en el pie, órgano fuente de la piruvatoquinasa objeto de nuestro estudio.

La bibliografía publicada sobre el estudio de las distintas facetas que presenta el proceso analítico de insecticidas organoclorados es muy abundante. Resultan de especial interés los números monográficos recientemente dedicados al análisis de pesticidas por J. Chromatographic. Science (1975).

El proceso conjunto de preparación y análisis de la muestra consta según PERTIERRA (1977) de cuatro partes: extracción, limpieza, formación de derivados y análisis. La formación de derivados es una exigencia técnica en ciertos casos, ante la imposibilidad del análisis por cromatografía de gases de los insecticidas en estado original. En el presente trabajo, no ha habido necesidad de realizar esta etapa ya que no existen inconvenientes en detectar los compuestos organoclorados directamente.

De todas formas, dada la gran variedad de muestras, naturaleza química de los insecticidas y sensibilidad de los detecto-

res cromatográficos, es imposible describir un proceso analítico de aplicación universal, al depender cada fase del mismo de las características de las fases posteriores. Así por ejemplo un detector cromatográfico selectivo capaz de detectar 10^{-12} g. (pg) de aldrín permite eliminar con frecuencia la purificación previa de la muestra por cromatografía de adsorción.

Preparación de la muestra: maceración y extracción:

Mejillón entero y órganos aislados de mejillón, se trocearon con el fin de que la muestra tomada resulte lo más homogénea posible. De las muestras así obtenidas se pesaron diferentes cantidades en balanza de precisión.

En el caso de que la extracción deba realizarse en tejidos, debe ir precedida de la maceración de la muestra con el objeto de conseguir una total homogeneización de la misma, para lo que se utiliza la cantidad necesaria de arena fina, calcinada y lavada con ácido, que disgrega los tejidos y células y en presencia de sulfato sódico anhidro, que retiene los líquidos protoplásmicos, en los que se encuentran disueltos los insecticidas contenidos en los distintos tejidos y órganos.

La operación se realiza en un mortero de cristal, cuyo contenido se traspasa, una vez suficientemente homogeneizado a un

cartucho de celulosa de filtro "Albet", para que a su través pasen los líquidos de extracción, lavando las paredes y el fondo del mortero con el disolvente empleado para evitar pérdidas de la muestra, e incorporando el disolvente al cartucho. La duración de la extracción en el aparato Soxhlet depende de las características de cada muestra; para nuestro trabajo, utilizando hexano como disolvente, hemos empleado 5 horas.

La concentración del extracto se realiza por evaporación en un aparato Kuderna-Danish, con objeto de evitar que el disolvente arrastre pesticida y sin llegar a la evaporación a sequedad del extracto.

Purificación de los extractos.

Para la eliminación de cualquier interferencia en el análisis cuantitativo por cromatografía Gas-Líquido de compuestos organoclorados procedentes de muestras biológicas, en la mayoría de los casos, se hace necesaria la previa eliminación en dichos extractos de una serie de sustancias generalmente de naturaleza lipídica o terpenoide.

Con el fin de conseguir el adecuado grado de pureza, se han desarrollado una serie de metodologías más o menos equivalentes, una de las cuales es la representada por la secuencia de operaciones citada por BALUJA y col. (1973).

El método conjunto de extracción y limpieza de la muestra conteniendo insecticidas organoclorados y organofosforados debida a MILLS y col. (1963), que emplea acetonitrilo, es el más empleado, constituyendo a la vez el fundamento de los surgidos posteriormente. Recientemente para la limpieza de muestras se están empleando las técnicas de cromatografía sobre gel con Sephadex L-H 20 para insecticidas organofosforados y Bio Beds SX-2 para insecticidas organoclorados, lo que permite separar insecticidas cuyos pesos moleculares estan comprendidos entre 200 y 400 del resto de los componentes de la muestra, generalmente con pesos moleculares más elevados (STALLING y col., 1972; STALLING, 1974; PFLUGMACHER y EBING, 1974).

Siempre que sea posible, lo más conveniente es prescindir de los métodos de reparto entre disolventes (a menudo más inseguros desde el punto de vista cuantitativo), para utilizar exclusivamente los basados en cromatografía de adsorción sobre un soporte activo, que es el utilizado en nuestro trabajo y que describimos a continua
ción.

Una columna de 1,5 cm. de diámetro interno se rellena hasta una altura de 12 cm. con Florisil (silicato de magnesio sintético) de 60-100 mallas, previamente activado por calentamiento a 650°C durante dos horas, cuidando que el empaquetamiento resulte apretado y homogéneo. Sobre el Florisil se deposita una capa de 2 cm. de espesor de Na_2SO_4 anhidro para asegurar que las soluciones pasen desecadas por el adsorbente activo. El extracto a purificar se añade cuantitativamente a la columna en un volumen que no debe

sobrepasar los 10 ml. El sistema se eluye sucesivamente con 100 ml. de hexano (fracción F-1) y 200 ml. de hexano-eter etílico 85-15 (v/v) (fracción F-2). Los índices de recuperabilidad obtenidos por este proceso, incluidas todas las operaciones, resultan suficientemente satisfactorios: del 95 al 98 por 100 para el grupo del DDT y del 88 al 90 por 100 para el aldrín y dieldrín (TEJEDOR, 1977).

TABLA II.- FASES ESTACIONARIAS Y PARAMETROS OPERATORIOS UTILIZADOS EN LOS ANALISIS POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO.

| Fase estacionaria (% sobre soporte) | Soporte | Temperaturas | | | Caudal |
|--|----------------------------------|--------------|-----|-----|--------------------------------|
| | | C | D | I | |
| SE-30(3,8%) (I) | Chromosorb W-HP 80-100 mallas | 195 | 260 | 265 | 37 ml/min (A/metano) |
| SE-30(1,2%) (II) | Chromosorb W-HP 80-100 mallas | 160 | 180 | 200 | 40 ml/min (N ₂) |
| DC-200 (5%) QF-1 (7,5%) (III) | Chromosorb W-HP 80-100 mallas | 195 | 210 | 220 | 45 ml/min (N ₂) |

Concluidas las operaciones de purificación de los extractos, se encuentran en condiciones de ser examinados por cromatografía Gas-Líquido. Dicho examen se realizó en dos etapas.

Análisis previos sin purificación del extracto: determinación cualitativa.

Dicho experimento se realizó en un aparato Hewlett-Packard 5753-G, provisto de detector de captura electrónica de Ni-63 (con sistema de pulsos de frecuencia constante). Se utilizó una columna de fase estacionaria Goma de Silicona SE-30 de características no polares, según la clasificación de ROHSCHENEIDER (1956). La goma de silicona es el pliméro del dimetil polisiloxano. Las fases estacionarias y parámetros operatorios utilizados en estos análisis se exponen en la tabla II (I).

Determinación cuantitativa.

Dicho examen se llevó a cabo en un aparato Perkin-Elmer F-11, con detector de captura electrónica provisto de electrodo concéntrico y fuente de radiación de Ni-63. Operando en condiciones óptimas de temperatura, voltaje y caudal de gas portador (N_2), permite la detección y cuantificación sin error significativo de cantidades de muestra del orden de 10^{-12} g. (pg.). Se utilizaron columnas de vidrio Pyrex, espirales de 2 m. de longitud y 3 mm. de diámetro interno, de dos tipos, cuya composición, así como los parámetros operatorios utilizados vienen especificados en la tabla II. La columna señalada como (III) en la mencionada tabla resulta de una eficacia superior a las anteriores especificadas en ella y es fundamen

tal para la resolución de extractos que contengan DDT, aldrín y los metabolitos de ambos insecticidas. Ninguno de los productos implicados en los análisis cromatográficos ofrece problemas de termolabilidad a las temperaturas de trabajo utilizadas.

2.2.13. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PIRUVATOQUINASA EN PRESENCIA DE INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS.

Para la determinación de la actividad enzimática en presencia de los insecticidas organoclorados se empleó el método espectrofotométrico, midiendo el decrecimiento en absorbancia del NADH consumido en el sistema de reacciones acopladas, según se ha especificado en el apartado 2.2.2.

Puesto que los insecticidas organoclorados son muy poco solubles en agua, hubo que emplear disolventes orgánicos adecuados como vehículos de dichos compuestos, por lo que fue preciso investigar la influencia que puede ejercer el disolvente del insecticida, sobre la actividad de la piruvatoquinasa, y cuyos resultados están expuestos en el apartado correspondiente de resultados.

Una vez seleccionado el disolvente adecuado para el insecticida, fue necesario estudiar los límites de concentraciones posi-

bles del insecticida fijados por la insolubilidad de estos compuestos en medio acuoso, lo que hacía que a determinadas concentraciones, la turbidez de la mezcla en la cubeta impidiera la medida de la variación de absorbancia.

Seleccionadas las concentraciones más adecuadas (que son las indicadas en cada caso en los apartados correspondientes de resultados), se pudo observar también, al preparar la mezcla de reacción, unas alteraciones débiles en el valor de la absorbancia, posiblemente debidas a la estabilización de la solubilidad del insecticida al pasar el haz de luz en el espectrofotómetro a través de la cubeta. Para evitar esto y conseguir una suspensión homogénea del insecticida en la cubeta de reacción, se adicionaba el insecticida a la misma y se mantenía durante 15 min. dentro del espectrofotómetro antes de la adición del sustrato PEP, para dar comienzo a la reacción enzimática. Pasado este período de tiempo (15 min.) se pudo comprobar que desaparecían las alteraciones de la absorbancia, manteniéndose en un valor constante. Este tiempo de contacto probablemente facilitaría la interacción de las moléculas del insecticida con la enzima.

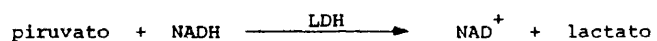
Como ya hemos indicado la medida de la actividad enzimática se estimaba mediante el método de BUCHER y PFLEIDERER (1955), de reacciones acopladas, usando láctico deshidrogenasa como enzima auxiliar. Ya que actuaban dos sistemas enzimáticos: piruvatoquinasa y lactato deshidrogenasa se debía realizar un estudio de la influencia de estos insecticidas organoclorados en cada sistema enzimático

por separado. Además el tiempo de permanencia de la cubeta dentro del espectrofotómetro podía afectar algunos de los reactivos presentes en la mezcla de reacción.

Se realizó una medida de la actividad de la piruvatoquinasa, inmediatamente después de mezclar los reactivos en la cubeta de reacción, tomándose esta prueba como control.

Una segunda medida se realizó, mezclando todos los reactivos excepto el sustrato PEP e introduciendo las cubetas en el espectrofotómetro, durante 15 min. y midiendo la actividad después de transcurrido este tiempo. Se pudo comprobar que la actividad enzimática no se afectaba por permanencia de la cubeta en el espectrofotómetro, usándose esta prueba como control, para medir la actividad en presencia del insecticida organoclorado.

El posible efecto sobre la lactato deshidrogenasa se estudió, según la reacción:



usando las concentraciones utilizadas en la medida de la determinación de la actividad enzimática de la piruvatoquinasa. La concentración de piruvato usada fue la misma que la que se usaba de PEP. Los resultados nos indicaron que en estas condiciones, la actividad de la lactato deshidrogenasa no se alteraba ni por la permanencia de la cubeta en el espectrofotómetro, ni por la presencia del insecti-

cida organoclorado.

Fijadas todas las condiciones indicadas anteriormente, se pudo comprobar una variación en la respuesta de la actividad de la piruvatoquinasa en presencia de insecticida, dependiente de la cantidad de proteína en cubeta, con lo cual en todos los experimentos realizados se utiliza una cantidad de extracto, dentro de los márgenes donde la respuesta del insecticida es apreciable.

2.2.14. VALORACION DE DATOS.

El método de mínimos cuadrados se utiliza para calcular curvas de ajuste cuando se dispone de una dispersión de puntos (SPIEGEL, 1970). En nuestro caso, se realizó el ajuste de rectas por mínimos cuadrados en las representaciones de Lineweaver-Burk y de Hill.

En las determinaciones de la influencia de insecticidas organoclorados, fijadas las condiciones especificadas en el apartado anterior, se calculó la desviación típica para una serie de valores obtenidos para una concentración de proteína e insecticida fija en cubeta, pudiéndose comprobar que todos los valores estaban en el intervalo : $\bar{x} \pm 2\sigma$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA PIRUVATOQUINASA DE PIE DE MEJILLÓN (MYTILUS EDULIS L.).

3.1.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION.

Como primer paso para el estudio de la piruvatoquinasa, objeto del presente trabajo, en relación con sus propiedades cinéticas y de influencia de efectores e insecticidas organoclorados, fue necesario poner de manifiesto su existencia en el pie y otros órganos del mejillón.

Para la puesta en evidencia de la actividad enzimática, es decir, para su aislamiento, se determinó la actividad utilizando la técnica descrita en el apartado 2.2.2. por medida espectrofotométrica y empleando condiciones óptimas de pH y concentración de sustrato. Para ello se ha utilizado como material enzimático distintas partes del mejillón.

Seleccionado el pie por su mayor actividad específica (3.1.1.1.) y por no haber sido estudiadas las propiedades de esta enzima en el mencionado órgano del mejillón, ha sido de interés, también con fines de purificación y estudio de esta actividad, seguir el curso de las variaciones que presenta esta enzima en función de

las distintas estaciones del año. Estos datos pueden poner de manifiesto si a lo largo de las oscilaciones de actividad enzimática tiene lugar algún proceso de regulación de la síntesis de la enzima y/o posibles isoenzimas.

Finalmente con el objeto de caracterizar a la enzima del pie de mejillón se ha procedido a su purificación parcial.

3.1.1.1. Exploración de la piruvatoquinasa de distintos órganos de mejillón.

La preparación de los extractos, determinación de la actividad enzimática y valoración de proteínas, se realizó de acuerdo con lo indicado en los apartados correspondientes de Material y Métodos.

Los resultados expuestos en la tabla III, reflejan que la actividad específica más elevada, de los diferentes órganos examinados corresponde al pie.

Como ya hemos mencionado, es conocido el hecho de la gran variabilidad respecto a la actividad, comportamiento y propiedades

que presenta una misma enzima, no sólo en diferentes organismos, sino en las diferentes partes de éstos: tejidos, órganos e incluso en distintas clases de músculos con diferente función fisiológica. Incluso para el mismo tipo de músculo, la actividad enzimática varía de acuerdo con la parte de músculo elegido. Así se sabe que la parte anterior del músculo lateral de peces difiere en varios aspectos de la posterior, por ejemplo en el contenido de glucógeno (NAGAYAMA, 1961; FRASER y col., 1966), intermediarios glicolíticos, estructura celular, y actividades enzimáticas, y es precisamente la piruvatoquinasa una de las enzimas que muestran más marcadas diferencias en músculo de trucha (SHIBATA, 1977).

Según lo anteriormente expuesto consideramos de interés comparar las propiedades de la piruvatoquinasa de manto (LIVINGSTONE y BAYNE, 1974; LIVINGSTONE, 1975) y músculo aductor (DE ZWAAN, 1972; DE ZWAAN y HOLWERDA, 1972; HOLWERDA y DE ZWAAN, 1973; HOLWERDA y col., 1973) de mejillón, con los resultados obtenidos por nosotros en pie del mencionado animal.

La mayor actividad piruvatoquinásica en pie parece indicar una gran actividad metabólica, al menos en lo que se refiere a glicolisis en este órgano. Como ya indicamos (1.2.1.) este órgano puede desarrollar una gran tensión muscular con el consiguiente consumo energético, posiblemente procedente en su mayor parte de la utilización de glucosa.

TABLA III. ACTIVIDAD PIRUVATOQUINASICA EN DIFERENTES ORGANOS DE MEJILLON.

| Organo | Actividad | Proteínas | Actividad específica |
|----------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| | U/g. tejido fresco | mg/g.tejido fresco | U/mg. |
| Hepatopáncreas | 2,2 | 43,8 | 0,050 |
| Manto | 3,1. | 53,5 | 0,058 |
| Pie | 7,3 | 22,3 | 0,330 |

3.1.1.2. Variación estacional de la actividad de la piruvatoquinasa y contenido en proteínas en pie de mejillón.

Siguiendo la línea de exploración de actividad enzimática anteriormente expuesta y utilizando el pie de mejillón como órgano de estudio, hemos pretendido determinar las oscilaciones en actividad enzimática a lo largo de los meses del año. La figura 7 muestra la variación estacional de piruvatoquinasa de pie de mejillón.

Como muestran los resultados (figura 7), existe un nivel máximo de actividad enzimática que corresponde con el período estacional del verano y luego un decrecimiento para el período de otoño.

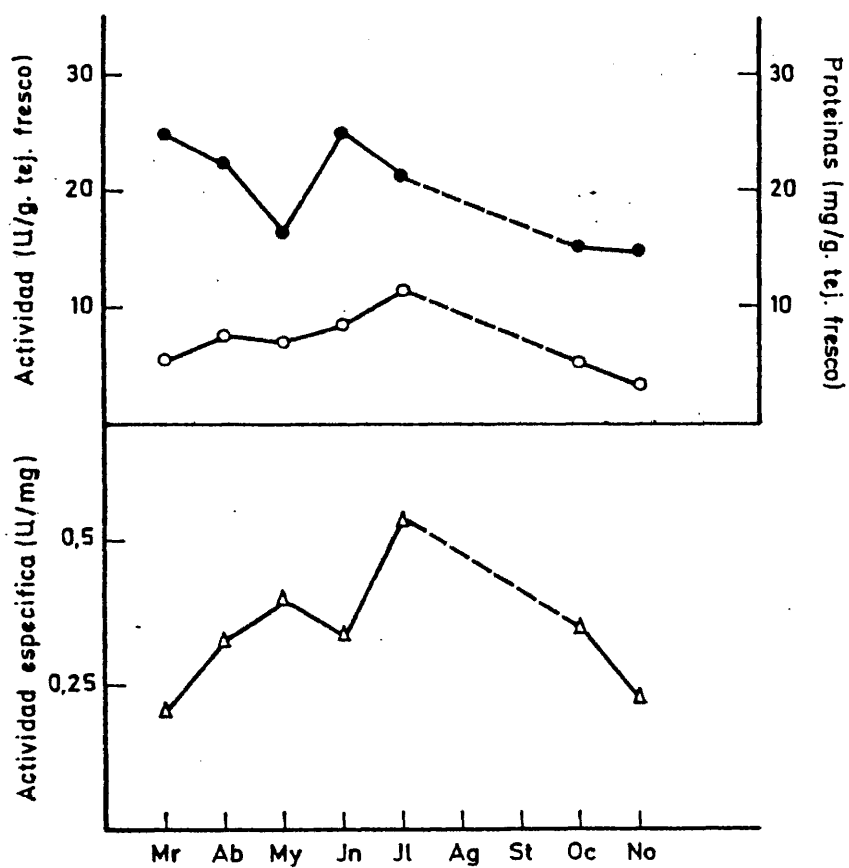


Figura 7 - Variación estacional de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

- Actividad U/g. tejido fresco
- Proteínas mg/g. tejido fresco
- △ Actividad específica U/mg.

De primavera a verano, hay un aumento en la actividad. Con respecto al contenido en proteínas, el máximo nivel corresponde al principio de verano existiendo un período de decrecimiento en la primavera y en el otoño.

El máximo período de desaparición de proteínas y de descenso de la actividad enzimática de la piruvatoquinasa, coincide con el letargo invernal (DE ZWAAN y ZANDEE, 1972a). La máxima actividad de la piruvatoquinasa coincide con el período de máxima acumulación de glucógeno en *M. edulis* según DE ZWAAN y ZANDEE (1972a; 1972b), quienes encuentran que los cambios que ocurren respecto al contenido de glucógeno son mucho menos marcados en músculos y pie que en las restantes partes del mejillón, considerados como tanto por ciento en peso de tejido seco.

Los ciclos estacionales en mejillón reflejan una interacción compleja entre abastecimiento alimenticio y temperatura, y entre crecimiento y ciclo reproductivo anual. Durante el período de verano -freza y/o descanso, hay abundante alimentación y la demanda de energía de las reservas metabólicas es baja en contraste con lo que ocurre en el otoño y en el invierno debido a la gametogénesis.

El aumento de actividad de la piruvatoquinasa puede ser debido a un efecto inductor por la presencia de glúcidos, como es el caso de la piruvatoquinasa de levaduras (FERNANDEZ y col., 1967). KREBS (1965) y KREBS y EGGLESTON (1965) muestran que con una dieta rica en carbohidratos, la actividad de la piruvatoquinasa en hígado

de rata es bastante más alta que en regímenes nutricionales que favorecen gluconeogénesis, tales como ayuno o una dieta baja en carbohidratos.

Por otra parte, AHMAD y CHAPLIN (1979), en un estudio sobre variaciones estacionales en el metabolismo anaeróbico de *M. edulis*, han encontrado un máximo en el mes de mayo y otro en el mes de julio respecto a la incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ en metabolitos en la utilización de la vía del succinato. Explican que la excepcionalmente alta incorporación en mayo puede estar relacionada con la estación de cría de estos animales. El contenido de glucógeno es alto, como ya hemos indicado, pero la demanda de energía también lo es, con lo que la velocidad de glicolisis será elevada.

Dado además que en todos los experimentos realizados para determinar la posible existencia de formas isoenzimáticas (3.1.4.) de la PK, no se manifestó su presencia en diferentes meses del año, parece que no es posible considerar la probable síntesis de una nueva isoenzima, aún en las condiciones más favorables de aumento de actividad enzimática (período de verano).

3.1.1.3. Estabilidad de la piruvatoquinasa de pie de mejillón.

Conocida la existencia de la mencionada actividad enzimá

tica de pie de mejillón y su variación estacional, con el fin de realizar los ensayos en las condiciones óptimas de extracción y conservación de la enzima, hubo que realizar experimentos previos conducentes a establecer el medio extractivo que favorece la estabilidad de la misma en relación con la temperatura y el tiempo.

Como indica la figura 8, la piruvatoquinasa de pie de mejillón manifiesta una notable pérdida de actividad cuando los extractos se preparan utilizando como medio homogeneizante Tris-HCl 50 mM. pH 7,5 conteniendo EDTA 1 mM. Por otra parte la adición de diferentes compuestos como el glicerol y el 2-mercaptoetanol este último a diferentes concentraciones, ponen de manifiesto su efecto estabilizante, más bien a corto plazo, sobre la enzima, tanto a temperatura de -20°C como a temperaturas de +4°C y +20°C.

En los resultados expuestos en la mencionada figura se ha considerado 100, el valor correspondiente a la actividad de una muestra control medida inmediatamente después de preparar el extracto.

La menor estabilidad del 2-mercaptoetanol a largo plazo y a temperatura de +20°C puede explicarse por el carácter más volátil de este compuesto.

Se comprobó que tanto la presencia de 2-mercaptoetanol como la de glicerol en las concentraciones usadas, no tenían influencia sobre la velocidad de reacción de la piruvatoquinasa.

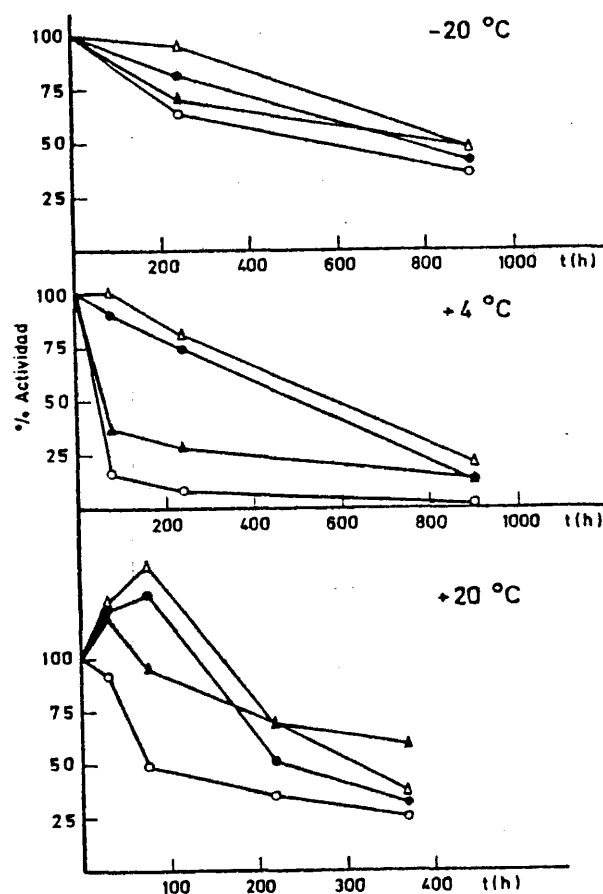


Figura 8.- Estabilidad de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 EDTA 1 mM.

Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM., 2-mercaptoeranol 3 mM.

Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM., 2-mercaptoetanol 6 mM.

Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM., glicerol 30 % (v/v).

Comotambién puede observarse en la figura 8 (A) en períodos cortos de tiempo, la máxima estabilidad corresponde al medio que contiene 2-mercaptoetanol 6 mM. por lo que se adoptó como medio homogeneizante Tris-HCl 50 mM. pH 7,5, conteniendo EDTA 1 mM y 2 mercaptoetanol 6 mM.

3.1.1.4. Purificación parcial de la enzima.



BIBLIOTECA

Con el fin de avanzar en la caracterización enzimática de la piruvatoquinasa se procedió a ensayar un método de purificación sencillo que nos permitiera trabajar con un mínimo de interferencias por otras actividades enzimáticas acompañantes. Para ello se utilizó como material de partida el extracto enzimático preparado utilizando como medio de homogeneización, el que confiere mayor estabilidad a la enzima, ya indicado anteriormente. Para la purificación de la enzima se ha empleado el tratamiento con sulfato amónico seguido de posterior diálisis.

DE ZWAAN y HOLWERDA (1972), en un estudio sobre piruvatoquinasa de músculo aductor de *M. edulis*. expone que aproximadamente el 95 por 100 de la piruvatoquinasa precipita entre un margen de 45 y 65 por 100 de saturación con sulfato amónico. Sobre esta base se realizaron experimentos para estudiar el comportamiento de la piruva

toquinasa de pie de mejillón frente al tratamiento con sulfato amónico.

A este efecto el extracto de pie de mejillón fue tratado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, hasta conseguir un 30 por 100 de saturación, siguiendo el procedimiento que se describe en Material y Métodos (2.2.4.), se dejó reposar y una vez transcurrido el tiempo indicado se sometió a centrifugación. El sobrenadante se llevó a 40 por 100 de saturación, separando el precipitado por centrifugación. Al sobrenadante de este tratamiento se le añadió nuevamente sulfato amónico hasta conseguir un 60 por 100 de saturación. El precipitado obtenido en este proceso se disolvió en solución tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 conteniendo EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM. En los sobrenadantes correspondientes se determina la actividad enzimática y el contenido en proteínas.

Los resultados (figura 9) revelan que la enzima precipita con sulfato amónico casi en su totalidad entre un margen del 30 por 100 y el 60 por 100 de saturación.

La purificación obtenida con el tratamiento por sulfato amónico es de dos veces y el rendimiento de aproximadamente 85 por 100 (tabla IV).

Durante la diálisis, realizada según se ha especificado en el apartado correspondiente (2.2.4.) se observó la aparición de un precipitado que se separó por centrifugación y en el cual una vez

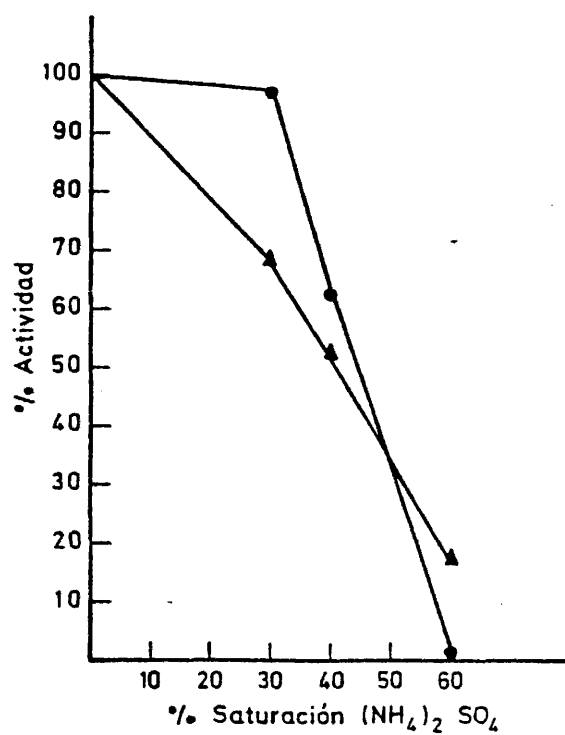


Figura 9 - Precipitación con sulfato amónico de piruvato-quinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.).

- Actividad enzimática en el sobrenadante.
- ▲ Proteína total en el sobrenadante.

TABLA IV.- PURIFICACION PARCIAL DE LA PIRUVATOQUINASA DE PIE DE MEJILLON.

| | Proteínas (mg/ml) | Actividad (U/ml) | A. específica (U/mg) | Purificación (factor) | Rendimiento (%) |
|--|----------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------|
| Homogeneizado | 3,9 | 0,93 | 0,24 | ----- | 100 |
| Sedimento 60% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 5,35 | 3,4 | 0,63 | 2,6 | 83,4 |
| Dializado | 1,8 | 1,66 | 0,92 | 3,8 | 82,4 |
| ===== | | | | | |
| (*) | | | | | |
| Sephadex G-150 | 0,33 | 1,97 | 5,95 | 25 | |
| DEAE-Sephadex A- 50 | 0,3 | 1,6 | 5,3 | 23 | |

(*) Este segundo proceso de purificación por columna se ha realizado con fines de detección de isoenzimas (véase 3.1.3.4.).

redissuelto en solución tampón se comprobó que no existía actividad piruvatoquinásica, consiguiéndose así una purificación de aproximadamente 4 veces con un rendimiento igual al obtenido en la precipitación con sulfato amónico.

3.1.2. PROPIEDADES ENZIMATICAS.

3.1.2.1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

Una gran mayoría de enzimas presentan acusada dependencia del pH del microambiente en que actúan, disminuyendo su actividad a ambos lados de un determinado intervalo. El efecto causado por la concentración de hidrogeniones sobre la actividad enzimática afecta principalmente a tres factores:

- 1.- Valores extremos de pH causan un efecto irreversible sobre la estructura protéica, entre los que se incluyen alteración de la energía de enlace y modo de fijación de los grupos prostéticos.
- 2.- Efectos sobre la ionización del sustrato y enzima.
- 3.- Efectos sobre la fijación del sustrato a la enzima y sobre su reactividad en la catálisis.

El pH óptimo de una enzima es un dato importante, puesto que no tiene que coincidir necesariamente con el pH de su entorno intracelular que puede hallarse sobre la pendiente ascendente o des

cendente de su curva de actividad al pH. Por lo tanto, la relación entre pH y actividad enzimática puede constituir un factor importante del control intracelular de la actividad de una determinada enzima.

Los experimentos llevados a cabo según se indica en el apartado 2.2.8. para determinar la actividad de la enzima a diferentes pHs en la mezcla de reacción, muestran una zona de pH óptimo entre 7,0 y 7,5 (figura 10).

Determinada la actividad enzimática en un margen de pH entre 3 y 11, se pudo observar que esta actividad es nula en la zona ácida a valores de pHs menores de 4,5 y por otra parte en la zona alcalina la actividad es ya muy débil a pH 11,0.

Estos datos no difieren notablemente como podemos observar en la tabla VII, de los obtenidos por LIVINGSTONE y BAYNE (1974) y DE ZWAAN y HOLWERDA (1972) para la misma enzima de manto y músculo aductor de mejillón (*M. edulis*).

3.1.2.2. Efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima.

Con el fin de determinar la estabilidad de la mencionada

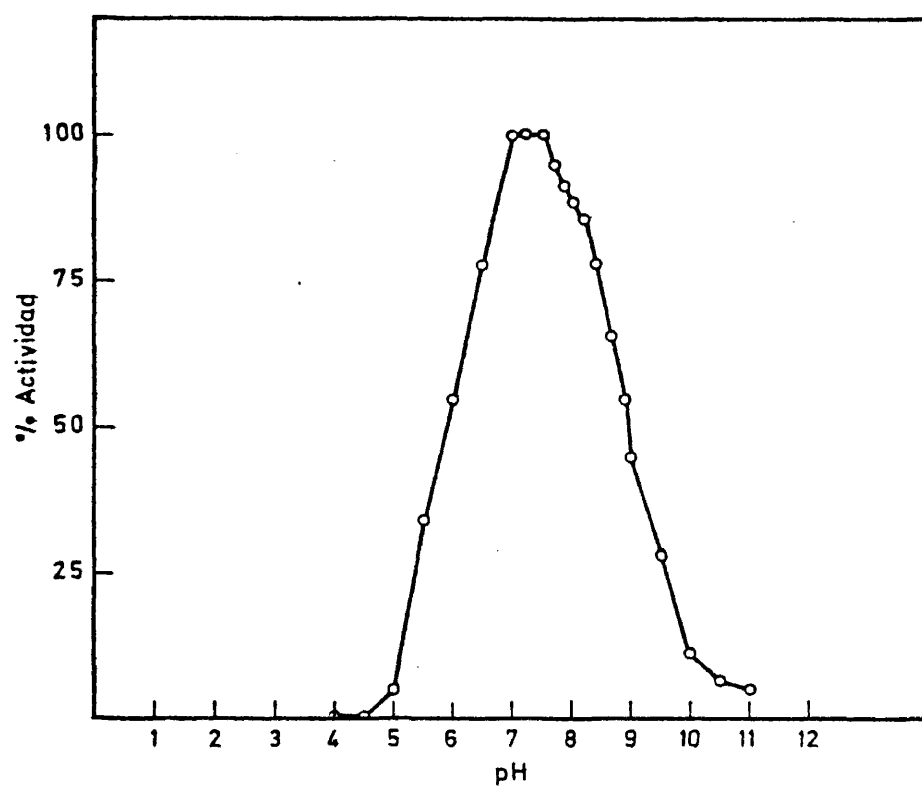


Figura 10 - Efecto del pH en la actividad de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

piruvatoquinasa a diferente pH, es decir, la capacidad de la enzima de ser inactivada irreversiblemente por diferentes concentraciones de hidrogeniones, se realizaron experimentos utilizando soluciones tampón de pHs comprendidos entre 3,0 y 12,0 con intervalos de 0,5 unidades entre dos ensayos consecutivos.

Los resultados presentados en la figura 11, muestran que la enzima mantiene el 100 por 100 de su actividad durante 15 min. a 37°C a pHs comprendidos entre 7,0 y 9,0. A valores de pH de 3,5 y 12,0 la enzima se inactiva completamente. La gráfica de estabilidad de la piruvatoquinasa de pie de mejillón, expresada como actividad residual de la enzima tras el tratamiento indicado, muestra una simetría más acusada que la gráfica de actividad al pH, siendo también más acentuada la meseta de la gráfica correspondiente a la estabilidad, que la de la curva de actividad.

Por otra parte no se han encontrado datos en la bibliografía sobre estudios de este tipo en piruvatoquinasa de mejillón que permita una comparación de estos resultados.

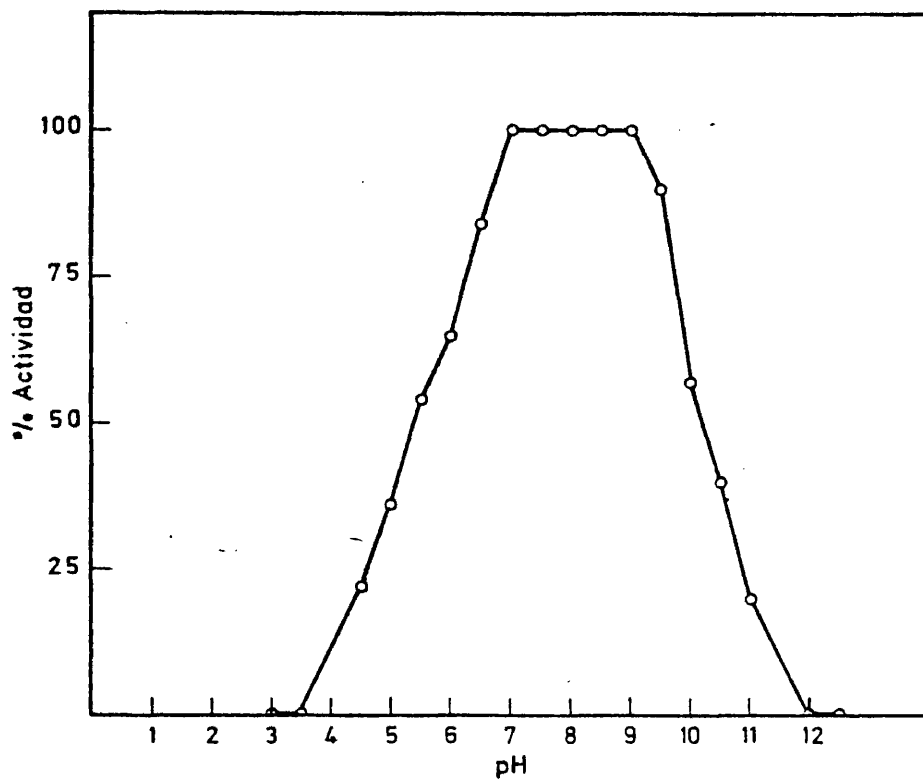


Figura 11 - Efecto del pH en la estabilidad de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

3.1.2.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima.

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción catalizada por la piruvatoquinasa de pie de mejillón se recoge en la figura 12.

La representación del logaritmo de la velocidad frente a la inversa de la temperatura absoluta es lineal entre 20 y 35°C. El cálculo de la energía de activación de Arrhenius a partir de la gráfica B (figura 12), da un valor de 5.500 calorías por mol (23.000 J. por mol). El coeficiente de temperatura Q_{10} en el intervalo lineal es de 1.4, valor que está entre los límites dados para reacciones catalizadas por enzimas (tabla V).

3.1.2.4. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima.

Los resultados del estudio de la reacción de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima aparecen en la figura 13. Como se observa en la gráfica correspondiente, la enzima conserva el 100 por 100 de su actividad cuando se mantiene durante 15 min. a pH 7,5 a -20°C y a +20°C., y hasta 50°C la actividad residual dismi

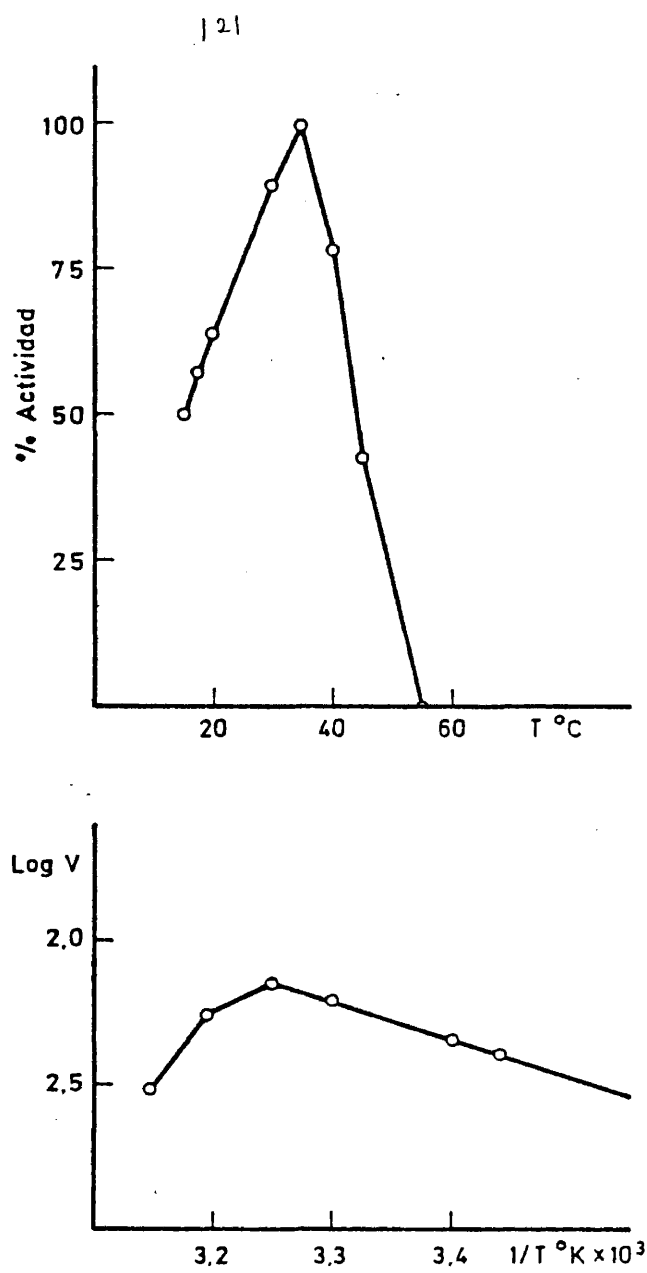


Figura 12 - Efecto de la temperatura en la actividad de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

nuye de una forma muy poco acusada, siendo a ésta última temperatura (50°C), todavía el 90 por 100. La actividad se anula completamente cuando la enzima se somete a la temperatura de 70°C en las condiciones indicadas. Los datos de la gráfica (figura 13), nos han permitido obtener la temperatura de semiinactivación que corresponde a 57.5°C. Este dato nos será útil para determinar la inactivación a esa temperatura en función del tiempo, a fin de poder investigar la posible presencia de isoenzimas (3.1.4.).

TABLA V.- VALOR DEL COEFICIENTE DE TEMPERATURA (Q_{10})

| <u>Intervalo de temperaturas (°C)</u> | <u>Q_{10}</u> |
|---------------------------------------|----------------------------|
| 15 - 25 | 1,5 |
| 20 - 30 | 1,4 |
| 25 - 35 | 1,35 |

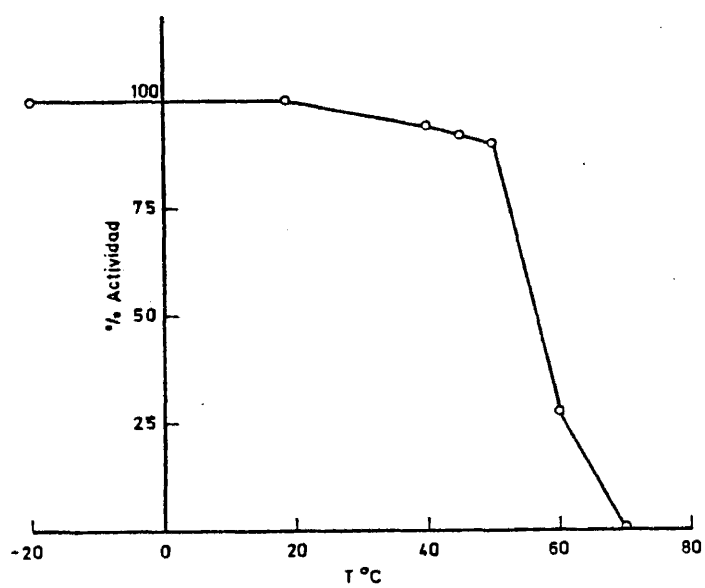


Figura 13 - Efecto de la temperatura en la estabilidad de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

3.1.3. COOPERATIVIDAD Y ALOSTERISMO. PARAMETROS CINETICOS.

Se han descrito, para las enzimas reguladoras, los fenómenos de cooperatividad y alosterismo. Puesto que la piruvatoquinasa es una enzima clave que cataliza una etapa fisiológicamente irreversible en la glicolisis, es sin duda una de las enzimas reguladoras de esta vía metabólica. Prueba de ello es que está sometida a fenómenos de control grosero y fino. Con respecto a este último control la cooperatividad y el alosterismo son dos manifestaciones de su naturaleza reguladora.

Cooperatividad y alosterismo son dos fenómenos reguladores que obedecen a dos hechos diferentes. Un sistema enzimático dado puede exhibir uno o cualquiera de estos fenómenos o los dos (FROMM, 1975).

Se dice que una enzima presenta cooperatividad respecto al sustrato cuando una molécula de sustrato facilita la unión de otra molécula de sustrato a la enzima o por el contrario dificulta dicha unión. En el primer caso existe cooperatividad positiva y en el segundo cooperatividad negativa.

Por definición, las enzimas que son alostéricas tienen, además del sitio activo catalítico, un segundo sitio topológicamente distinto o sitio alostérico. Aunque el sitio alostérico carece

de actividad catalítica es capaz de afectar la catálisis del sitio activo. Cuando ciertos moduladores o efectores se unen al sitio alostérico, las propiedades catalíticas del sitio activo se alteran.

En el caso de sistemas que muestran cinéticas cooperativas, la sigmoidicidad (representación asociada a la cooperatividad) puede aumentar o ser eliminada. Hay enzimas que presentando cinética michaeliana normal, pueden exhibir sigmoidicidad, inhibición o activación en presencia del efector alostérico. Estos efectos se manifiestan como alteraciones en los parámetros cinéticos de la enzima, modificando de esta manera la forma de la curva de ciertas representaciones, respecto a las correspondientes que ofrecen las enzimas con cinética michaeliana normal.

3.1.3.1. Cooperatividad positiva del sustrato fosfoenolpiruvato (PEP).

Representación de Lineweaver-Burk.

Como es conocido, las representaciones de Lineweaver-Burk pueden ser un dato en una primera aproximación para poder poner de manifiesto la existencia de fenómenos cooperativos y/o alostéricos.

Las representaciones de Lineweaver-Burk que se obtienen cuando existe interacción homotrópica son generalmente curvadas. La curvatura hacia arriba corresponde a interacción homotrópica posi-

tiva (cooperatividad positiva) y hacia abajo a la interacción homotrópica negativa (cooperatividad negativa) (FARAGO, 1967; MAHLER y CORDES, 1971; LE JOHN, 1971).

Las representaciones de Lineweaver-Burk para PEP como sustrato (figura 14) muestran una ligera curvatura hacia arriba que se hace mas acusada para las concentraciones mas bajas de PEP.

Cálculo de R_s .

Según se indicó en el apartado 2.2.7., el comportamiento sigmoideal o michaeliano de una enzima se puede distinguir a partir del valor de una constante llamada R_s (figura 14).

Para la determinación de este valor en piruvatoquinasa de pie de mejillón se realizaron cinco experimentos resultando un valor medio de 20.6, siendo 81 el valor teórico correspondiente al comportamiento michaeliano de una enzima.

El valor obtenido por nosotros, está de acuerdo con los resultados anteriores en el sentido de confirmar la cooperatividad positiva respecto al sustrato PEP.

Queremos hacer constar que el valor de R_s , que es muy claro teóricamente, no lo es tanto al obtener el valor experimental sobre la representación michaeliana. Su valor puede ser unido a otros confirmatorio de un hecho

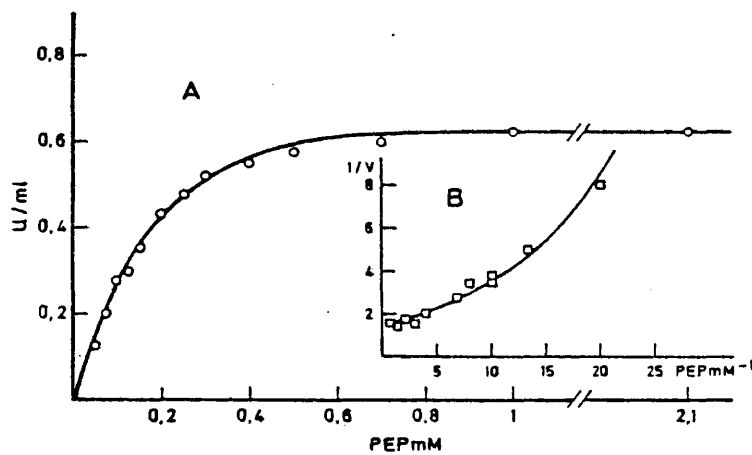


Figura 14 - Representación de Michaelis-Menten (A) y Lineweaver-Burk (B) para la actividad de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

Cálculo del coeficiente de Hill.

La representación del log de $v/V-v$ frente al log. de la concentración de sustrato (PEP), para la piruvatoquinasa de pie de *M. edulis*. da una línea recta, cuya pendiente (coeficiente de Hill) tiene un valor mayor que la unidad, lo cual indica cooperatividad positiva respecto a PEP. Las experiencias realizadas para su determinación dan un valor medio para "h" de 1.6 (figura 15).

Representación de v/V / PEP frente a v/V .

Esta representación guarda analogía con la propuesta por SCATCHARD (1949) (y la descrita por Hofstee y Augustinsson), para determinar números de sitios de unión de los ligandos por molécula de proteína, así como el valor de K_d (constante de disociación del complejo proteína-ligando). En el caso de aplicarse este criterio para enzimas que al unirse a los ligandos (sustratos) lo transforman, no se puede hablar de una constante de disociación del complejo enzima-ligando, manteniéndose éste inalterado, puesto que los ligandos unidos serían transformados en productos, y esta transformación en producto estaría regida por una nueva constante de velocidad (K_2), razón por la cual en un sentido estricto no se debe apli

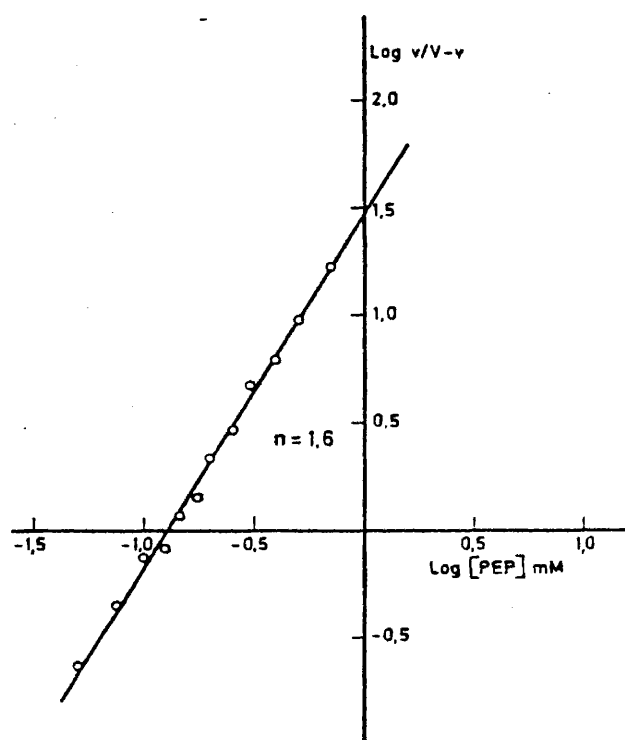


Figura 15 - Representación de Hill para la curva de saturación de piruvatoquinasa por PEP, en pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

car la denominación de Scatchard a esta representación. No obstante KOSHLAND (1970) indica que mediante la representación de Scatchard, de la forma de la gráfica que se obtenga se puede deducir la existencia o no de cooperatividad y el tipo de esta en un sistema enzimático. De todas formas esta estimación sería válida si en el caso que estamos considerando de la piruvatoquinasa de pie de mejillón, se cumpliesen al menos los siguientes requisitos:

- 1.- Que por medirse las velocidades iniciales de reacción, la concentración de enzima ligando (ES) quede prácticamente inalterada, pudiendo considerarse que el sistema $E + S \rightleftharpoons ES$ está en equilibrio.
- 2.- Que en la reacción catalizada por la piruvatoquinasa, por ser bisustrato, el segundo sustrato (ADP) no afecte al equilibrio mencionado.
- 3.- Que el mecanismo de la reacción, no conocido para la piruvatoquinasa de pie de mejillón, objeto de este trabajo, tampoco altere dicho equilibrio.

Con las anteriores suposiciones podría ser posible considerar que la medida de la V máxima sea indicativa de la concentración de E_t , y a su vez la medida de v sería un índice de la concentración del complejo ES, a concentraciones no saturantes de sustrato.

En consecuencia se podría admitir de una forma aproximada que esta representación, si bien desde un criterio estrictamente físico-químico, no es la que corresponde a las condiciones establecidas por Scatchard, puede utilizarse como un medio para evaluar cooperatividad en un sistema enzima-sustrato.

La representación de v/V / PEP frente a v/V para la piruvatoquinasa de pie de mejillón da una curvatura indicativa de cooperatividad positiva (figura 16).

De todo lo expuesto anteriormente podemos deducir que la piruvatoquinasa de pie de mejillón presenta cinética sigmoideal en presencia del sustrato. Este hecho se pone de manifiesto mediante los siguientes resultados ya mencionados:

- 1.- La representación de Lineweaver-Burk no da una línea recta sino que es un poco curvada hacia arriba.
- 2.- El valor de R_s que en cinética normal michaeliana debe ser de 81, adquiere en este caso un valor de 20.6.
- 3.- El coeficiente de Hill tiene un valor en todas las experiencias realizadas (3) mayor que la unidad, con un valor medio de 1.6.
- 4.- La representación v/V / PEP frente a v/V da una línea cuya curvatura está de acuerdo con la existencia de cooperatividad positiva.

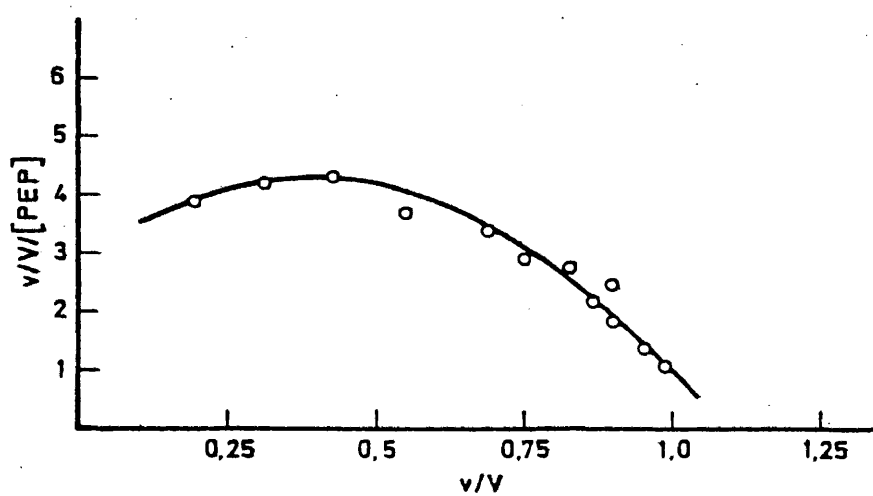


Figura 16 - Representación de $v/V/[PEP]$ frente a v/V para piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.).

3.1.3.2. Determinación de $K_{SO,5}$

Puesto que en los datos expuestos anteriormente hemos hablado de la existencia de cooperatividad positiva del sustrato PEP para la piruvatoquinasa, que se manifiesta en una cinética sigmoide, no se puede hablar de constante de Michaelis puesto que esta denominación sería impropia, ya que la enzima no exhibe cinética con representación hiperbólica. Sin embargo, podemos obtener un valor, que corresponde a la concentración de sustrato para la que se obtiene la mitad de la velocidad máxima y a este valor se le denomina $K_{SO,5}$.

La determinación de la $K_{SO,5}$ para fosfoenolpiruvato se realizó utilizando las condiciones de ensayo previamente descritas en el apartado 2.2.2., y usando concentraciones de PEP que variaron en un margen entre 5×10^{-2} mM y 210×10^{-2} mM. para una concentración fija de ADP (140×10^{-2} mM).

La evaluación de $K_{SO,5}$ se realizó a partir de las siguientes representaciones de datos:

- 1.- A partir de las representaciones de Michaelis-Menten. La evaluación de la $K_{SO,5}$ se realizó de la forma normal utilizada para la determinación de la K_m en cinética normal.

2.- A partir de las representaciones de Lineweaver-Burk. En este caso se eliminaron los valores que corresponden a concentraciones más bajas de PEP donde era más acusada la curvatura. Los modelos matemáticos dados para explicar el comportamiento sigmoidal de determinadas proteínas oligoméricas coinciden en que a altas concentraciones de sustrato, la ecuación que expresa el comportamiento de la enzima es la de una hipérbola. Las representaciones de Lineweaver-Burk en el caso de enzimas con cinética sigmoide es como ya hemos dicho una línea curva, pero eliminando los valores de sustrato que corresponden a bajas concentraciones, dará una línea recta ya que la ecuación matemática es una hipérbola y se puede extrapolar y hallar el valor de $K_{SO,5}$.

Representaciones que corresponde a la forma "R" de la terminología de "MONOD".

Para la obtención de las rectas, los puntos se ajustaron por mínimos cuadrados (figura 17), prescindiendo de los puntos indicados (generalmente a partir de una concentración de PEP que da una velocidad inferior a la mitad de la velocidad máxima).

3.- A partir de las representaciones de Hill. El punto donde \log de $v/V-v$ se hace igual a cero corresponde a $K_{SO,5}$.

El valor de la K_m para el ADP se estimó a partir de la re

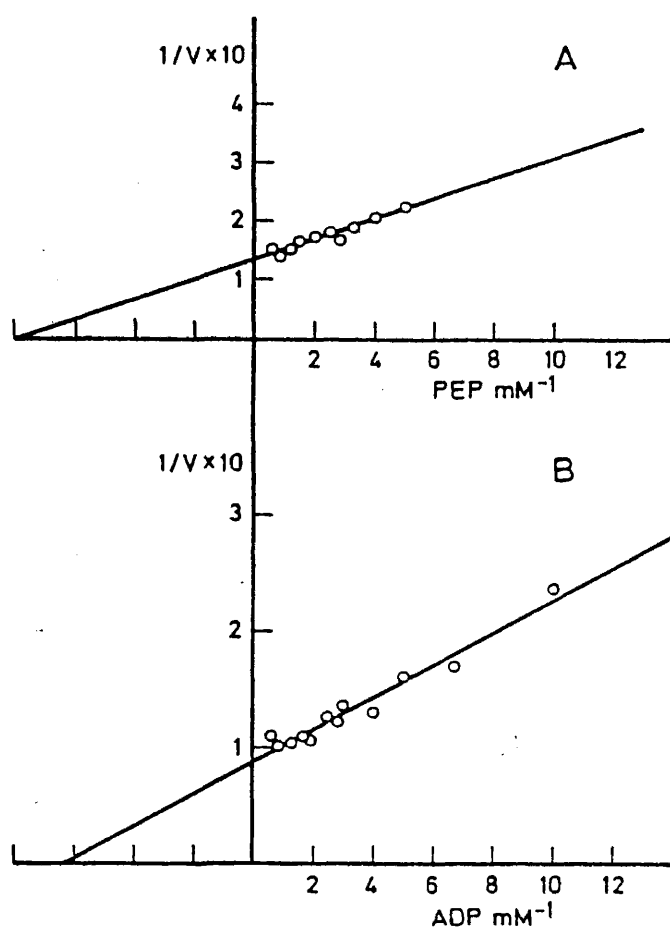


Figura 17 - Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de piruvatoquinasa de pie de *Mytilus edulis* frente a PEP (A) y ADP (B).

presentación de Lineweaver-Burk, siendo éste de 0,160 mM. (figura 16 "B")'

En la tabla VI se expresan los valores de $K_{SO,5}$ obtenidos en los tres tipos de representaciones citadas, así como los valores de otras constantes.

TABLA VI.- PARAMETROS CINETICOS DE PIRUVATOQUINASA DE PIE DE MEJILLON.

| Tipo de representación de datos | $K_{SO,5}$ | Coefficiente de Hill (h) | R_s |
|------------------------------------|-------------------|-----------------------------|--------------|
| Michaelis-Menten | 0,129 mM. (n = 6) | ----- | 20,6 (n = 5) |
| Lineweaver-Burk | 0,135 mM. (n = 5) | ----- | ----- |
| Hill | 0,132 mM. (n = 3) | 1,6 (n = 3) | ----- |

n = número de experimentos.

3.1.3.3. Efectores alostéricos.

Ya se ha mencionado la influencia de ciertas moléculas (efectores), que pueden modificar la cooperatividad del sustrato pa

ra una determinada enzima, pudiendo presentar efectos positivos o negativos sobre la cooperatividad ya descrita.

Aunque los primeros estudios sobre este tipo de modulación se han centrado en el estudio de sustancias inhibidoras, no por eso se puede descartar la importancia de sustancias activadoras que se puede considerar que actúan mediante un mecanismo análogo. Este es el caso de la piruvatoquinasa estudiado que manifiesta modulación por ambos tipos de efectores.

Efecto de la Fructosa-1,6-biofosfato sobre la actividad de la enzima.

En la figura 18, se muestran las curvas de velocidad frente a la concentración de sustrato PEP en ausencia y presencia de FbP. Cuando la FbP está ausente, se puede observar como ya hemos indicado (3.1.3.1.), una débil dependencia atípica de la velocidad de reacción respecto a la concentración de sustrato; hay un efecto homotrópico positivo, respecto a PEP. La adición de FbP (0,1 mM) cambia esta cinética a hiperbólica y da una línea recta en las representaciones de Lineweaver-Burk.

El coeficiente de Hill en presencia de FbP es aproximadamente la unidad (1,08), lo que indica que la presencia de este efec

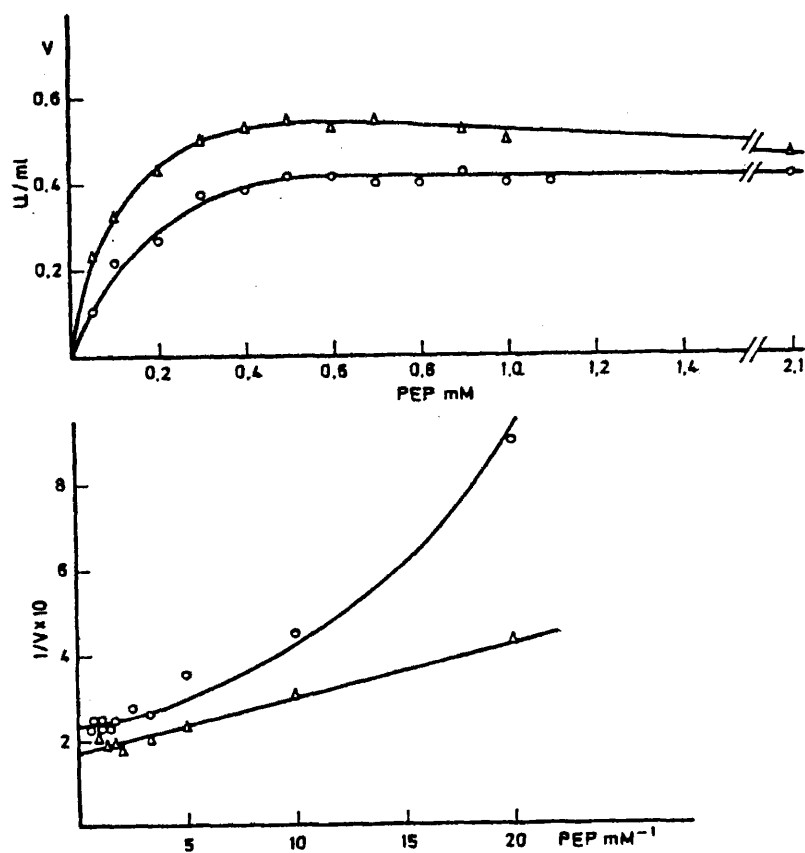


Figura 18 - Efecto de Fructosa-1,6-bifosfato en la actividad de la piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

○ Control

△ En presencia de Fructosa-1,6-bifosfato.

tor hace desaparecer la cooperatividad positiva de PEP (figura 19).

El valor de la $K_{SO,5}$ en ausencia de FbP es de 0,135 mM y en su presencia toma un valor de 0,065 mM. (podría en este caso decirse que se trata de K_m dado la aparición de la cinética hiperbólica).

El efecto activador de la FbP se manifiesta de una forma más potente a bajas concentraciones de PEP siendo bastante menos apreciable a altas concentraciones de este sustrato.

Las distintas investigaciones realizadas acerca de la piruvatoquinasa de distintos orígenes, muestran que los organismos ectotermos exhiben en sus propiedades respecto a determinados efectores, diferencias más acusadas que las que presenta la enzima de músculo de mamífero. SOMERO y HOCHACHKA, (1968), han mostrado que la piruvatoquinasa de músculo blanco de trucha es activada por FbP. Este mismo efecto ha sido encontrado para la piruvatoquinasa de músculo aductor de ostra (MUSTAFA y HOCHACHKA, 1971), sin embargo en ambos casos la enzima no presenta cinética sigmoidal aún en ausencia de este efector. DE ZWAAN y HOLWERDA (1972) señalan en piruvatoquinasa de músculo aductor de mejillón, el efecto de la FbP en el cambio de cinética sigmoidal a cinética hiperbólica normal. LIVINGSTONE y BAYNE (1974) encuentran también este mismo efecto en piruvatoquinasa de manto de este mismo bivalvo.

•

Como se acaba de exponer, nuestros trabajos sobre piruva-

140

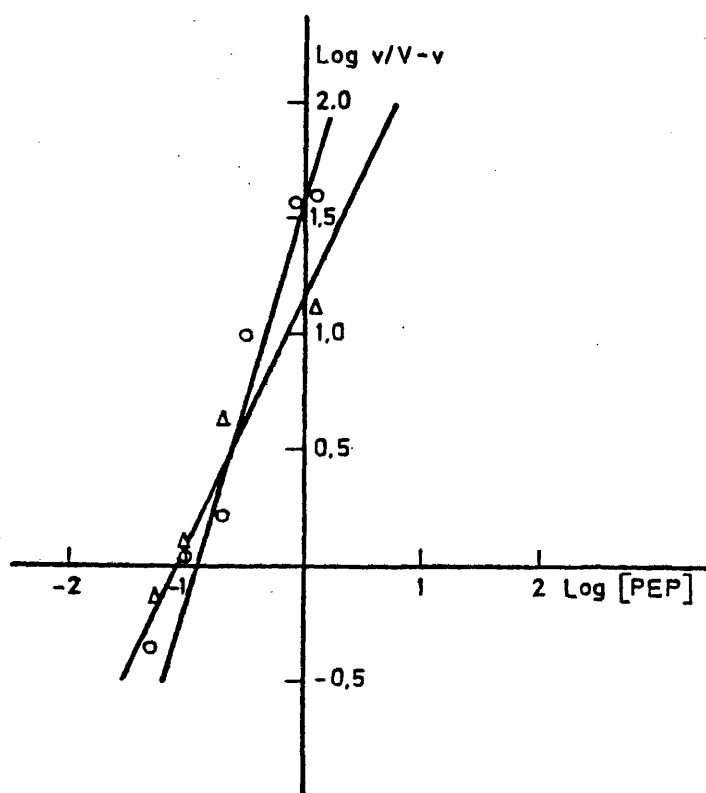


Figura 19 - Representaciones de Hill para la curva de saturación de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

o Control (PEP)

Δ En presencia de Fructosa-1,6-bifosfato.

toquinasa de pie de mejillón, manifiestan el mismo tipo de efecto por FbP que el ejercido en la misma enzima de los órganos anteriormente citados de mejillón.

Efecto de la alanina en la actividad de la enzima.

La alanina se manifiesta como un inhibidor de la piruvatoquinasa de pie de mejillón. Este efecto inhibidor es anulado por la presencia de FbP.

La figura 20, muestra las curvas de velocidad frente a la concentración de sustrato en presencia de alanina y de alanina más FbP. La alanina aumenta el perfil sigmoidal de la curva de velocidad frente a la concentración de sustrato, es decir se manifiesta como un efector alostérico negativo. La presencia de FbP (0,1 mM.) anula el efecto producido por la alanina (2 mM.) manifestando a su vez su efecto activador y transformando el perfil sigmoidal de la curva en hiperbólico, lo cual se expresa en un cambio en el valor del coeficiente de Hill que en presencia de alanina es de 2,10 (figura 21) y en presencia de alanina más FbP es de 1,05; así como en las representaciones de Lineweaver-Burk.

El valor de $K_{SO,5}$ varía en presencia de alanina, siendo en este caso de 370 mM.

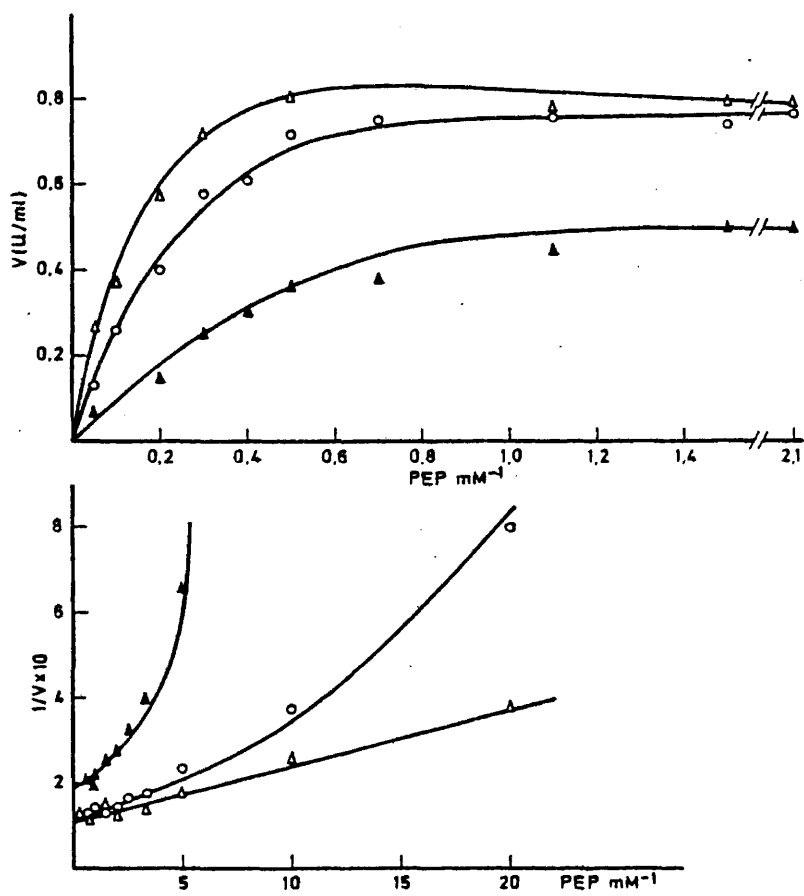


Figura 20 - Efecto de alanina y alanina en presencia de Fructosa-1,6-bisfosfato en la actividad de la piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

- Control
- ▲ En presencia de alanina
- △ En presencia de alanina y Fructosa-1,6-bisfosfato.

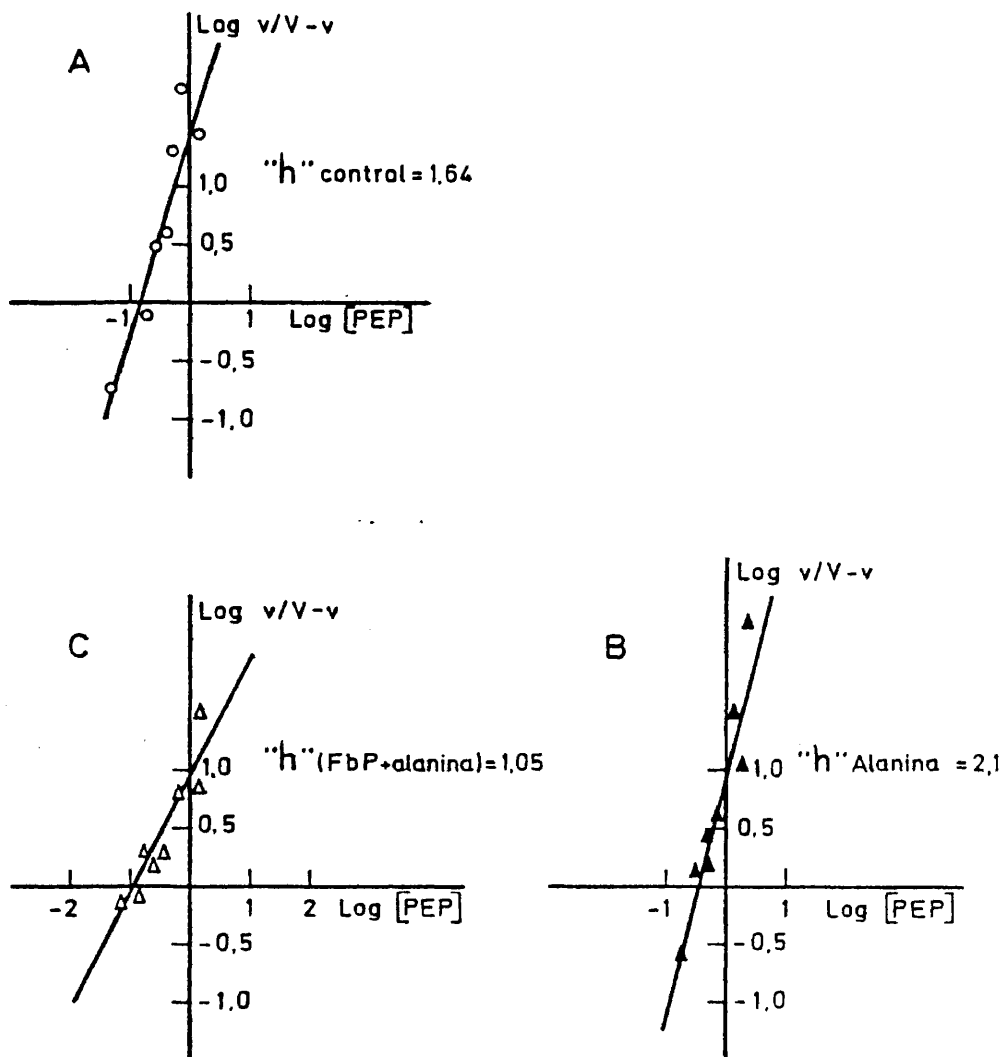


Figura 21 - Representaciones de Hill para la curva de saturación de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

A: Control

B: En presencia de alanina

C: En presencia de alanina y Fructosa-1,6-bisfosfato.

La inhibición por alanina, que es también conocida en piruvatoquinasa de hígado de rata (WALKER y POTTER, 1973; CARBONELL y col., 1973), es de singular importancia en el caso de la enzima de mejillón, ya que este compuesto se forma como producto final de la glicolisis en el metabolismo anaeróbico de este animal. Junto con un descenso de pH por acumulación de ácidos orgánicos, un aumento de la concentración de alanina inhibe la actividad de la piruvatoquinasa de mejillón favoreciendo así la carboxilación de PEP, ya que la concentración de FbP es suficientemente baja en estas condiciones.

El efecto de alanina en músculo aductor de mejillón ha sido descrito por HOLWERDA y DE ZWAAN (1973). La presencia de alanina afecta al valor de la $K_{SO,5}$ para el PEP pero deja el valor de la velocidad máxima prácticamente inalterado.

En manto de mejillón los resultados obtenidos por LIVINGSTONE y BAYNE (1974), muestran que la alanina aumenta la sigmoidicidad de la curva, disminuyendo a su vez la velocidad máxima. Este mismo efecto ha sido encontrado en manto y músculo aductor de ostra (MUSTAFA y HOCHACHKA, 1971).

En los resultados obtenidos por nosotros el efecto inhibidor de la alanina afecta tanto a la V_{max} como a la $K_{SO,5}$ con respecto a PEP. Si se comparan estos resultados de piruvatoquinasa de pie de mejillón, con los referidos anteriormente en otros órganos de este molusco, se puede concluir que las propiedades de regulación por alanina de la piruvatoquinasa de pie de mejillón son más similares a las del manto que a las del músculo aductor.

Tipo de inhibición producido por alanina.

Una vez descrito que la alanina es un potente inhibidor de la piruvatoquinasa de pie de mejillón, resulta del máximo interés establecer el tipo de inhibición que ésta sustancia ejerce.

Los resultados expuestos en la figura 22, en la cual se expresa la representación de Lineweaver-Burk utilizando concentraciones de sustrato que dan una linealidad a la gráfica, ponen de manifiesto, que la alanina como ya hemos señalado afecta tanto a la V_{max} como a la $K_{SO,5}$ de la piruvatoquinasa con respecto al sustrato PEP.

Como se ha citado anteriormente la modulación de la piruvatoquinasa por alanina es de tipo alostérico ya que altera no solamente la afinidad enzima-sustrato sino también la cooperatividad de la reacción, desplazando la curva de velocidad en relación a la concentración de sustrato, hacia la derecha variando el valor del coeficiente de Hill.

Distintos autores (WEBER y col., 1968; ROZENGURT y col., 1970), han descrito que la alanina inhibe a la piruvatoquinasa en forma competitiva frente al sustrato PEP; nuestros resultados como se desprende de la gráfica obtenida no están de acuerdo con estas afirmaciones. Sin embargo, teniendo en cuenta que las representaciones de

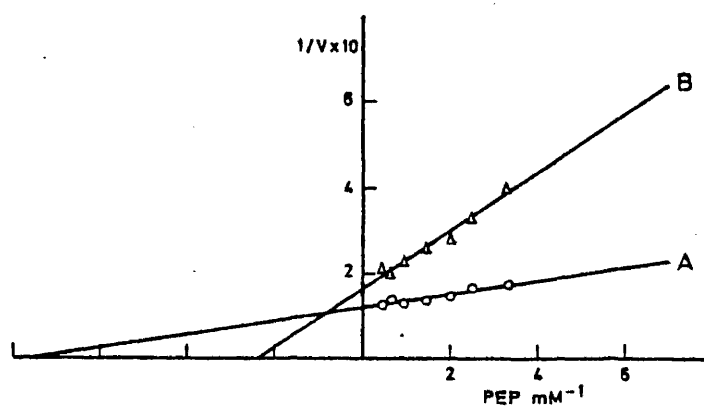


Figura 22 - Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de piruvatoquinasa frente a PEP (A) y PEP en presencia de alanina (B) en pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

Lineweaver-Burk se han realizado despreciando los valores de baja concentración de sustrato, tampoco puede decirse exactamente el tipo de inhibición encontrado en virtud de esta representación. No obstante no sería atrevido señalar que por la cierta analogía estructural entre el sustrato y el inhibidor pudiese existir una competición por el centro activo de la enzima. Por otra parte, el hecho de que en presencia de FbP (con ninguna analogía estructural con la alanina) anule completamente dicha inhibición hace pensar que la alanina puede tener en la enzima un sitio de unión alostérico.

Influencia del pH sobre el efecto de alanina y FbP.

En la figura 23, se puede observar el efecto de diversas concentraciones de alanina a dos pHs diferentes, y en presencia y ausencia de FbP, empleando concentraciones saturantes de PEP. Como se desprende de la gráfica, al pH de la máxima actividad de la piruuvatoquinasa de pie de mejillón, el 50 por 100 de inhibición de la enzima por alanina tiene lugar a una concentración 2.5 mM. A un pH más ácido (6,5), el 50 por 100 de inhibición se alcanza a una concentración de alanina de 0,5 mM.

La FbP (0,1 mM) anula completamente el efecto inhibitor de la alanina a cualquiera de las concentraciones ensayadas y a los dos pHs utilizados.

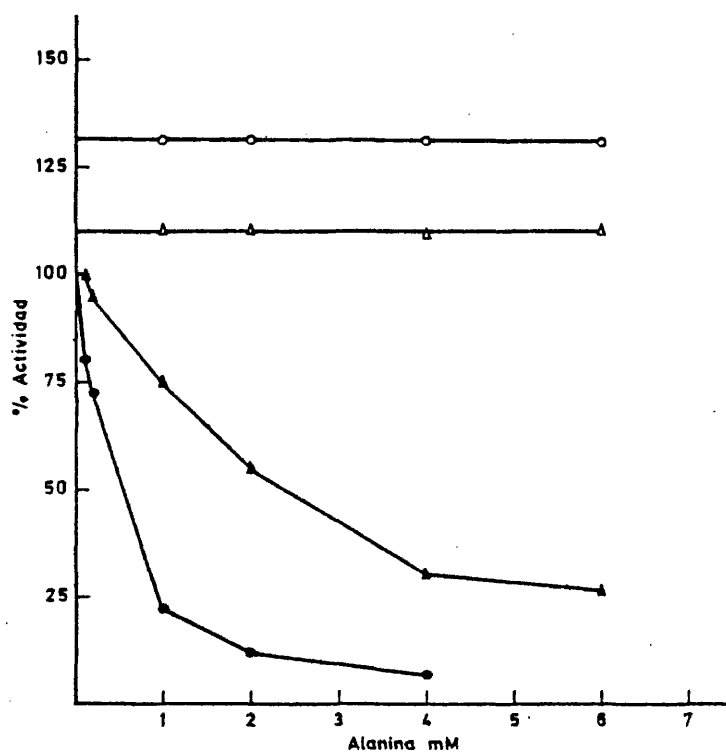


Figura 23 - Influencia de distintas concentraciones de alanina en la actividad de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

- pH 6,5
- ▲ pH 7,5
- pH 6,5 en presencia de fructosa-1,6-bifosfato
- △ pH 7,5 en presencia de Fructosa-1,6-bifosfato

También se puede observar en dicha figura que a medida que aumenta la concentración de alanina aumenta el grado de inhibición de la enzima. Este efecto ocurre para los dos pHs ensayados, sin embargo al pH de máxima actividad de la enzima (7,5), la inhibición por alanina no es total aún a la concentración de 6 mM, concentración que supera la concentración fisiológica de este aminoácido dada por DE ZWAAN (1972) para mejillón.

Al pH más bajo ensayado (6,5) y a concentración 4 mM de alanina, la inhibición que se ejerce es prácticamente total.

Así podemos concluir que el efecto de alanina así como el de FbP depende en gran medida del pH al cual estos compuestos actúan.

La influencia del pH sobre la cinética enzimática de la piruvatoquinasa de mejillón tiene según HOLWERDA y col., (1973), un alto significado fisiológico. Los bivalvos, tales como el *M. edulis*, son capaces de resistir condiciones anaeróbicas durante muchos días debido a su hábitat, acumulando alanina y una serie de ácidos orgánicos. Como la formación de ácidos dicarboxilícos tiene lugar fundamentalmente por carboxilación del PEP en vez del piruvato (DE ZWAAN y VAN MARREWIJK, 1973), en condiciones fuertemente anaeróbicas que provocan acidificación celular, la inhibición de la piruvatoquinasa por alanina que también se acumula en esas condiciones, puede tener un efecto beneficioso a fin de que se aumenten los niveles de PEP para que éste pueda ser carboxilado a oxalacetato y seguir la ruta metabólica más adecuada de acuerdo con las disponibilidades glucídicas.

cas del organismo.

El efecto de la FbP, metabolito que se acumula cuando la glicolisis es muy intensa, tiene también una gran importancia reguladora, ya que al suprimir la inhibición por alanina de la piruvatoquinasa a ambos pHs permite que el flujo glicolítico continúe en las condiciones anaeróbicas más extremas.

También se ha podido observar el efecto inhibidor de ATP sobre la piruvatoquinasa de pie de mejillón, (figura 24) siendo su influencia menos acentuada que en el caso de la alanina. De los pHs ensayados, 7,5 y 6,5 manifiesta más efecto a pH más ácido, adquiriéndose el 50 por 100 de inhibición a una concentración 3,5 mM de ATP, a este último pH.

De lo anteriormente expuesto podemos concluir que la actividad de la piruvatoquinasa de pie de mejillón es regulada por PEP, FbP, alanina, ATP y el valor del pH. Un papel regulador similar se le asigna a piruvatoquinasa de hígado de rata llamada tipo "L" (TANAKA y col., 1965; CARBONELL y col., 1973). El tipo "L" y la enzima de pie de mejillón tiene respuestas similares respecto a los efectores mencionados.

En la tabla VII se exponen las propiedades de piruvatoquinasa de manto, músculo aductor y pie de *M. edulis*.

De la observación de dicha tabla donde nuestros resultados

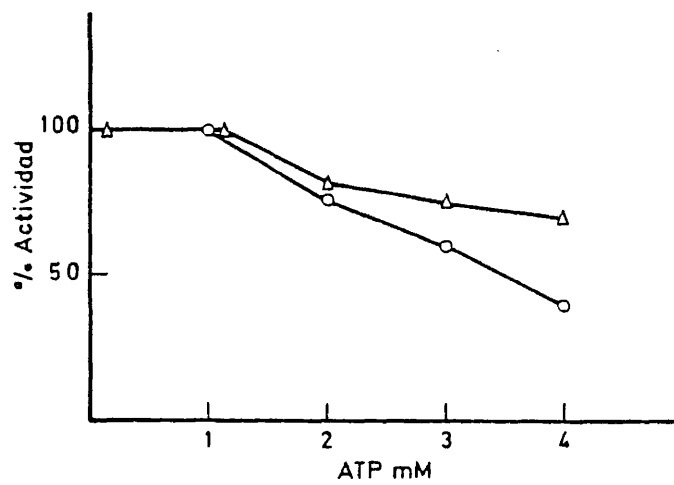


Figura 24 - Influencia de concentraciones variables de ATP en la actividad de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

○ pH 6,5

Δ pH 7,5

TABLA VII.- COMPARACION DE PARAMETROS CINETICOS DE PIRUVATOQUINASA DE PIE, MANTO
Y MUSCULO ADUCTOR DE MEJILLON (*MYTILUS EDULIS* L.).

| | Manto | Músculo aductor | Pie |
|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| $K_{SO,5}$ (PEP) (μ M.) | 230 | 650 | 132 |
| Inhibición por alanina. $K_{SO,5}$ | 1080 | 1580 | 370 |
| | Vmax. reducida alanina 1 mM. | Vmax. poco afectada alanina 2 mM. | Vmax. reducida alanina 2 mM. |
| Activación por FbP. $K_{SO,5}$ | 80 | 250 | 65 |
| | Vmax. no se afecta FbP 0,1 mM. | Vmax. no se afecta FbP 0,1 mM. | Vmax. poco afec- tada FbP 0,1 mM. |
| pH óptimo | 7,5 - 8,0 | 7,0 - 8,0 | 7,0 - 7,5 |
| Coef. de Hill "h" (PEP) | 1,3 | 1,3 | 1,6 |
| Coef. de Hill FbP (0,1 mM.) | --- | 1,0 | 1,08 |
| Coef. de Hill alanina (2 mM.) | --- | 1,75 | 2,1 |
| Coef. de Hill alanina y FbP | --- | --- | 1,05 |
| Alanina y pH | Inhib. mayor a pH más bajo | Inhib. mayor a pH más bajo | Inhib. mayor a pH más bajo |
| FbP y pH | Activ. independ. del pH | Activ. mayor a pH más bajo | Activ. mayor a pH más bajo |

obtenidos con pie de mejillón se comparan con los correspondientes a manto y músculo aductor, obtenidos por otros autores ya mencionados, se pueden deducir determinadas analogías y diferencias. La $K_{SO,5}$ en pie presenta un valor bastante más bajo que en los otros dos órganos, lo cual parece indicar una alta actividad metabólica para el pie del mencionado molusco, incluso en condiciones de baja concentración de sustrato.

Con respecto a la activación o inhibición de la piruvatoquinasa por efectores, los resultados son muy similares, se observa que la $K_{SO,5}$ en presencia de alanina resulta aumentada en todos los casos en una proporción similar y la activación por FbP que se manifiesta en una disminución del valor de la $K_{SO,5}$ en una proporción del mismo orden de magnitud.

El efecto cooperativo expresado como el coeficiente de Hill en relación con el sustrato PEP pone de manifiesto datos muy análogos para los tres órganos estudiados, valores que también se modifican en presencia de alanina y FbP en la misma proporción.

La inhibición por alanina, dependiente del pH que se expresa también en la tabla, resulta en todos los casos tanto mayor cuanto más bajo es el pH dentro de los límites ensayados. Por el contrario, salvo en el caso de la PK de manto, la activación por FbP resulta incrementada a medida que disminuye el pH.

•

En líneas generales podemos concluir que la PK de pie de

mejillón manifiesta propiedades similares a las encontradas en los otros órganos estudiados, con la salvedad de un valor en la $K_{SO,5}$ más bajo, lo que refleja una mayor afinidad por el sustrato PEP.

3.1.4. INVESTIGACION DE ISOENZIMAS.

Se admite generalmente que para que una enzima exhiba cooperatividad debe ser oligomérica, ya que los modelos teóricos más conocidos (MONOD y col., 1965; KOSHLAND y col., 1966), apoyan esta suposición. Sin embargo, existen excepciones como es el caso de la albúmina de suero bovino (KOLB y WEBER, 1972). La unión de ciertas moléculas a cadenas simples de albúmina de suero bovino parecen ser cooperativa cuando los datos se representan de acuerdo con la ecuación de Hill, y existen algunos modelos que tratan de explicar la existencia de cinéticas sigmoidales en proteínas monoméricas. Uno de ellos supone la existencia de múltiples vías para dar lugar a varios complejos enzima-sustrato cuando se une el sustrato al único sitio activo (SWEENEY y FISHER, 1968). Otro modelo que puede explicar datos cinéticos no hiperbólicos, lleva consigo cambios en la actividad catalítica de una enzima como una función del tiempo (FRIEDEN, 1970; FRIEDEN, 1979), lo que se conoce como fenómenos de histéresis.

La existencia de formas isoenzimáticas no presupone que la enzima esté constituida por subunidades en estructura cuaternaria, aunque este hecho se presenta con más frecuencia en enzimas oligoméricas, como es el caso de la lactato deshidrogenasa en mamíferos.

Para esta investigación se han realizado ensayos utilizando las técnicas de separación de cromatografía y electroforesis y por otra parte se ha determinado el curso de la inactivación térmica

de la enzima con extracto crudo y parcialmente purificado a la tempe
ratura de seminactivación en función del tiempo.

3.1.4.1. Cromatografía en Sephadex G-150 y DEAE-Sephadex A-50.

La cromatografía en columna se ha realizado utilizando dos tipos de fase estacionaria sucesivamente: Sephadex G-150 y DEAE Sephadex A-50. Para la primera se utilizó el extracto parcialmente pu
rificado procedente de la diálisis de la fracción 30-60 por 100 de saturación con sulfato amónico. En la segunda se utiliza la totali
dad de las fracciones con actividad enzimática procedentes de la cro
matografía anterior.

Como es sabido, el soporte Sephadex G-150 fracciona las proteínas en orden a su tamaño molecular y DEAE-Sephadex A-50 las fracciona además en orden a su carga iónica.

Los resultados obtenidos en esta forma de fraccionamiento, se expresan en las gráficas correspondientes a las figuras 25 y 26, en las que pueden observarse los perfiles de elución correspondientes a ambas cromatografías.

En la cromatografía de gel Sephadex G-150 se pone de mani
fiesto un solo pico de elución en una estrecha zona de fraccionamiento

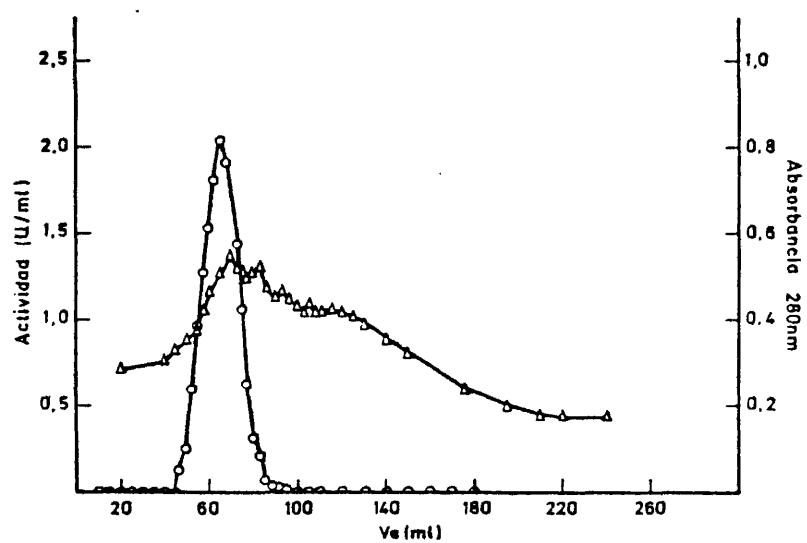


Figura 25 - Perfil de eluido de la cromatografía en Sephadex G-150.

- Actividad enzimática
- △ Proteínas (absorbancia a 280 nm.)

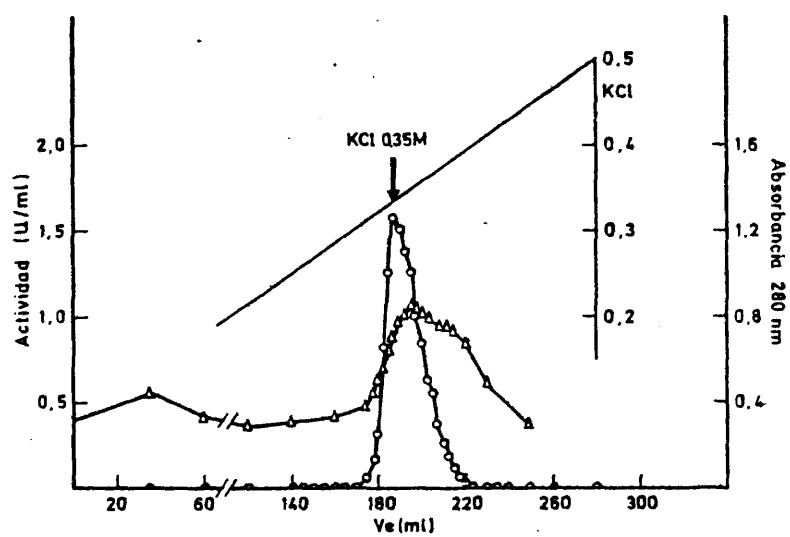


Figura 26 - Perfil de eluido de la cromatografía en DEAE-Sephadex A-50

○ Actividad enzimática

Δ Proteínas (absorbancia a 280 nm.)

to (correspondiente a un volumen de elución de 50 ml.). En ninguna otra zona de elución apareció actividad enzimática, si bien se detectaba la presencia de proteínas. Estos datos obtenidos permiten su gerir que la piruvatoquinasa de pie de mejillón, corresponde a una sola especie molecular, no revelando existencia de isoenzimas.

Para confirmar estos resultados, se sometió la mezcla conjunta de todas las fracciones eluidas que presentaban actividad enzi mática a cromatografía de cambio iónico, utilizando DEAE Sephadex A-50 y usando un gradiente de KCl 1 M. El perfil de eluido de la cro matografía en DEAE Sephadex A-50 (figura 26) muestra también un solo pico de actividad cuyo máximo eluye a una concentración 0,33 M. de KCl. Estos resultados confirman los anteriores en el sentido de la no existencia de isoenzimas de la piruvatoquinasa de pie de mejillón, al menos en las condiciones de ensayo utilizadas por nosotros, expues tas en el apartado 2.2.9 y 2.2.10.

Independientemente de los resultados expuestos sobre la no detección de formas isoenzimáticas, para cuyo fin se realizaron estas cromatografías descritas, es de interés señalar el grado de purificación obtenido en estos procesos, referidos a los máximos de los picos de elución (tabla IV).

3.1.4.2. Electroforésis en gel de poliacrilamida.

La electroforésis en gel de poliacrilamida como es conocido, separa las proteínas en disolución basándose en las diferentes velocidades de migración cuando se exponen a la acción de un campo eléctrico y un pH determinado que no coincide con el punto isoeléctrico.

La preparación de los geles y la técnica de electroforesis empleada se encuentra descrita en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

El desarrollo electroforético se realizó en muestras con diferente grado de purificación: extracto crudo (A), extracto procedente de la fracción del 30-60 por 100 de precipitación con sulfato amónico (B), extracto dializado (C) y en el eluato de la cromatografía de DEAE Sephadex A-50 (D), (figura 27).

En todos los casos ensayados se obtiene solamente una zona con actividad enzimática de la piruvatoquinasa (figura 27) determinada según se ha indicado en el apartado 2.2.11.

MUSTAFA y HOCHACHKA (1971), estudiaron las propiedades de la piruvatoquinasa de ostra (*C. gigas*) en diferentes tejidos de este bivalvo marino. Solamente el músculo aductor muestra dos bandas en su desarrollo electroforético. El manto y las branquias muestran una

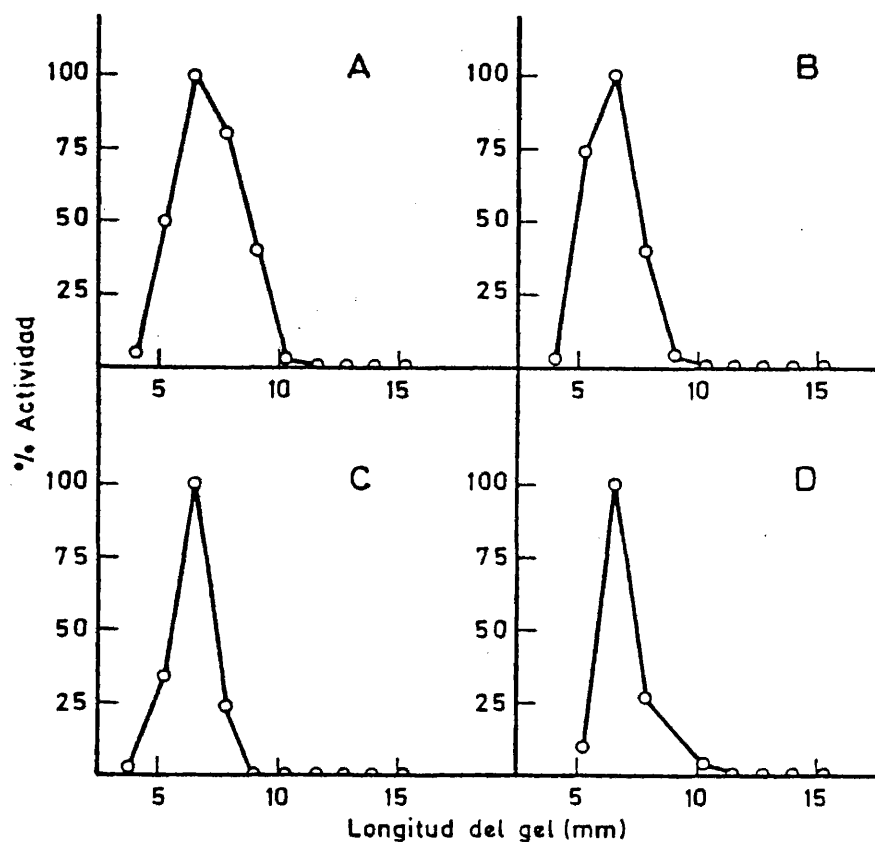


Figura 27 - Comportamiento electroforético en gel de poliacrilamida

A: Extracto crudo

B: Extracto procedente de la fracción 30-60 por 100 de saturación con sulfato amónico.

C: Extracto dializado frente a EDTA

D: Eluato de la cromatografía de DEAE-Sephadex A-50

movilidad electroforética similar y sólo aparece una banda con actividad de piruvatoquinasa.

En contraste con los resultados expuestos anteriormente, DE ZWAAN y HOLWERDA (1972), encuentran que la piruvatoquinasa de músculo aductor de *M. edulis* no manifiesta formas diferenciables utilizando la técnica de electrofoenfoque. Estos autores utilizan para sus experimentos dos fracciones de piruvatoquinasa de diferente actividad específica. Las dos fracciones manifiestan un amplio pico y al menos otros tres más pequeños e interpretan estos resultados en el sentido de que los varios picos están ampliamente relacionados y deben ser agregados de idénticas subunidades o monómeros con diferente número de agregación.

En relación con la enzima del manto LIVINGSTONE y BAYNE (1974), sugieren la existencia de isoenzimas para explicar la variación estacional de la $K_{SO,5}$ con respecto a PEP de esta piruvatoquinasa.

En nuestros experimentos, como ya hemos indicado, en todas las fracciones observadas se manifiesta el mismo comportamiento electroforético, no apareciendo en ningún caso formas de piruvatoquinasa distinguibles electroforéticamente y además, el hecho de que aparezca un solo pico de actividad en todas las fracciones ensayadas, parece confirmar aún más la no existencia de formas isoenzimáticas.

3.1.4.3. Actividad residual a la temperatura de semiinactivación en función del tiempo.

Estos experimentos han sido realizados con el fin de poder detectar la posible existencia de formas isoenzimáticas en la piruvatoquinasa de pie de mejillón, utilizando una metodología completamente distinta a la anterior, siguiendo el curso de la inactivación en función del tiempo.

Como se puede observar en la figura 28, la enzima conserva el 50 por 100 de su actividad durante 5 min. a 57,5°C, lo cual confirma el valor observado para la temperatura de semiinactivación y presenta una inactivación de un 95 por 100 a los 150 minutos.

En las figuras 28 y 29, correspondientes a extracto parcialmente purificado y a extracto crudo respectivamente, se puede observar la existencia de dos curvas de diferentes pendientes. La primera con mayor pendiente de un período no superior a 15 minutos y después la otra con una pendiente menos pronunciada que se mantiene durante todo el intervalo de tiempo medido.

A la vista de estos resultados se pueden dar varias explicaciones:

- 1.- La forma de las curvas se puede atribuir a la presencia de

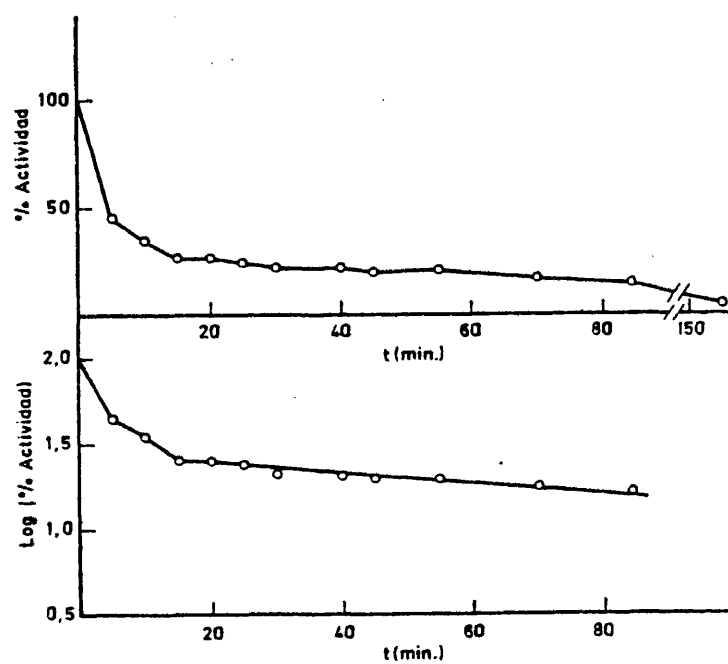


Figura 28 - Actividad residual a la temperatura de semi-inactivación en función del tiempo de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.) Extracto parcialmente purificado.

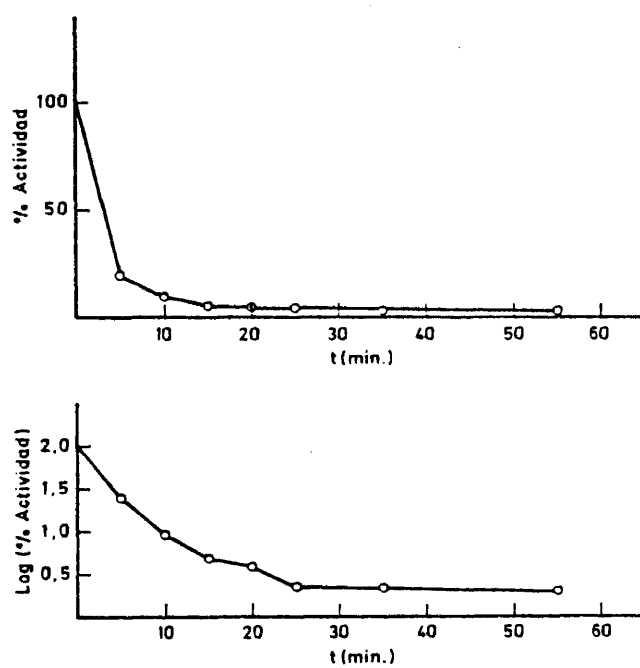


Figura 29 - Actividad residual a la temperatura de semi-inactivación en función del tiempo de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.) Extracto crudo.

dos isoenzimas, cada una de las cuales tendría una estabilidad térmica distinta, es decir que una sea más lábil que la otra, y así cada uno de los tramos rectos correspondería a una isoenzima.

- 2.- Que haya dos estados enzimáticos activos catalíticamente, uno el inicial o nativo y otro un intermedio formado en la termoactivación, todavía activo, con lo cual cada estado sería responsable de una pendiente.
- 3.- Que a partir de un cierto tiempo de calentamiento haya un cambio conformacional de reforzamiento de enlaces hidrofóbicos entre las subunidades o estructura cuaternaria por un mecanismo de histéresis (BOCK y FRIEDEN, 1978) que haga que se comporte como si fuese otra entidad o forma proteica. Estos resultados estarían de acuerdo con lo obtenido por electroforesis y cromatografía de gel y de cambio iónico.

No olvidemos que puede ser que realmente existan dos formas isoenzimáticas, una de las cuales no sea detectable por el método empleado por nosotros de cortado de gel en electroforesis, estando por debajo de los límites de detección de la concentración enzimática.

3.2. EFECTO DE INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PIRUVATOQUINASA DE PIE DE MEJILLON (MYTILUS EDULIS L.).

3.2.1. EXPLORACION DE LOS NIVELES DE INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS EN DIVERSOS ORGANOS DE MEJILLON.

Antes de comenzar el estudio del efecto de diversos insecticidas organoclorados sobre la piruvatoquinasa, se ha estimado conveniente hacer una exploración de los posibles niveles de estos compuestos, en mejillón entero y distintos órganos del mismo.

Con varios órganos de mejillón: hepatopáncreas, manto, branquias y pie, así como en el animal entero se prepararon los extractos para la determinación de la posible presencia de insecticidas organoclorados, por la técnica de cromatografía gas-líquido, según se indicó en el apartado correspondiente de Material y Métodos (2.2.12.).

Como el fin nuestro, no consiste en la determinación del contenido de insecticidas organoclorados en el mejillón, ni en la estimación de residuos de estos compuestos en el mencionado bivalvo, en diferentes zonas de localización de estos moluscos, se ha tomado una muestra al azar de las usadas en nuestros experimentos, con el

fin de establecer si el contenido de estos compuestos pudiese afectar la actividad enzimática de la piruvatoquinasa.

En la figura 30 se muestran los cromatogramas correspondientes a los órganos mencionados del mejillón y al animal entero, y también los cromatogramas correspondientes a extractos de dichos órganos con adición de insecticidas organoclorados.

Los perfiles cromatográficos para los distintos órganos, así como para el mejillón entero son cualitativamente similares, variando lógicamente la intensidad de la respuesta cromatográfica (intensidad de los picos). Unicamente existe un pico claro y diferente en el cromatograma correspondiente al pie, que posiblemente pueda ser debido a una sustancia colorante que da la tonalidad que presentan los extractos de este órgano, ya que una vez realizada la purificación de los extractos con columna de florisil (2.2.12) no aparece en los cromatogramas del pie.

Para una primera aproximación en la identificación de la naturaleza de estos picos cromatográficos, se realizaron inyecciones de soluciones patrón de diversos insecticidas organoclorados (figuras 30 y 31) unas posteriores a la inyección de la muestra y otras conjuntamente con ella, comprobándose en estos casos la superposición de los picos correspondientes. De esta forma se pudo observar la posible presencia en pie de mejillón de aldrín, dieldrín y lindano (figura 31), encontrándose además que una máxima acumulación de estos compuestos corresponde al hepatopáncreas y una mínima a las

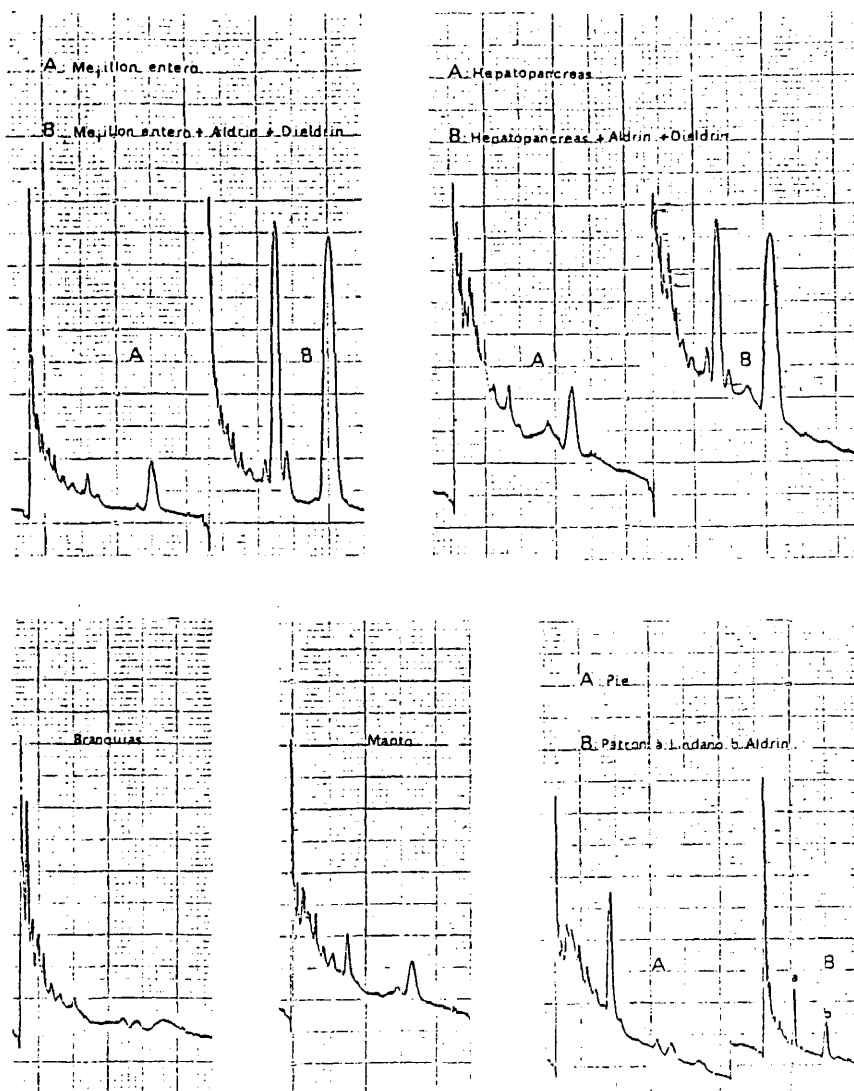


Figura 30 - Cromatogramas de identificación de insecticidas organoclorados en diversos órganos de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

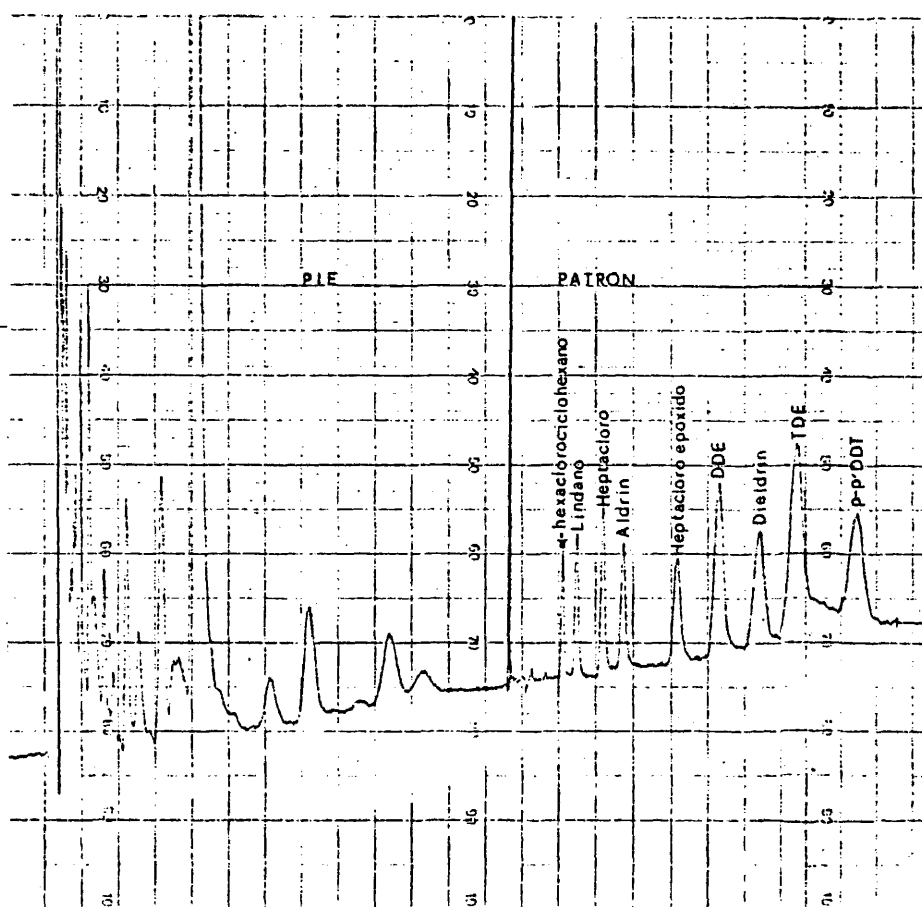


Figura 31 - Cromatogramas de identificación de insecticidas organoclorados en pie de mejillón (*Mytilus edulis*)

branquias, datos que están de acuerdo con los encontrados en los experimentos realizados por ROBERTS (1972) referentes a la forma de captación de estos insecticidas del medio y lugares principales de acumulación en su organismo.

Basados en estos experimentos previos, se procedió a la determinación cuantitativa en pie de mejillón de los insecticidas organoclorados, utilizando muestras purificadas y empleando los parámetros operatorios señalados en 2.2.12.

Para su determinación e identificación se inyectaron muestras de extractos de pie de mejillón y muestras patrón de concentración perfectamente conocida que contenían diversos insecticidas organoclorados: α -hexaclorociclohexano, γ -hexaclorociclohexano, heptacloro, heptacloroepóxido, dieldrín, aldrín, DDE, p,p'-DDT y TDE.

De esta forma se pudo identificar y determinar el contenido en pie de mejillón de aldrín (figura 32) eluido con hexano en la fracción F-1 de la columna de florisil y el lindano (figura 33) eluido con hexano-eter en la fracción F-2 de dicha columna (2.2.12).

Por comparación de las áreas de los picos en la muestra patrón y en las muestras problema, se determinó la cantidad de insectida organoclorado acumulado por el pie de mejillón, refiriendo esta cantidad a gramo de tejido fresco. La cantidad detectada de aldrín en pie de mejillón es de 0.03 μ g/g. de tejido fresco (ppm.) y la de

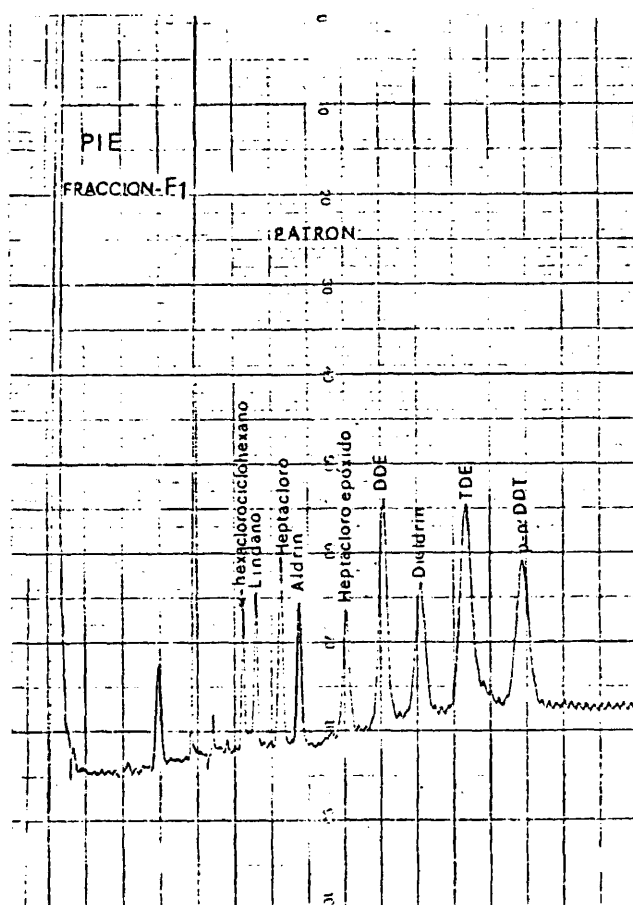


Figura 32 - Cromatogramas correspondientes a la fracción F1 de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.) y solución patrón de diversos insecticidas organoclorados.

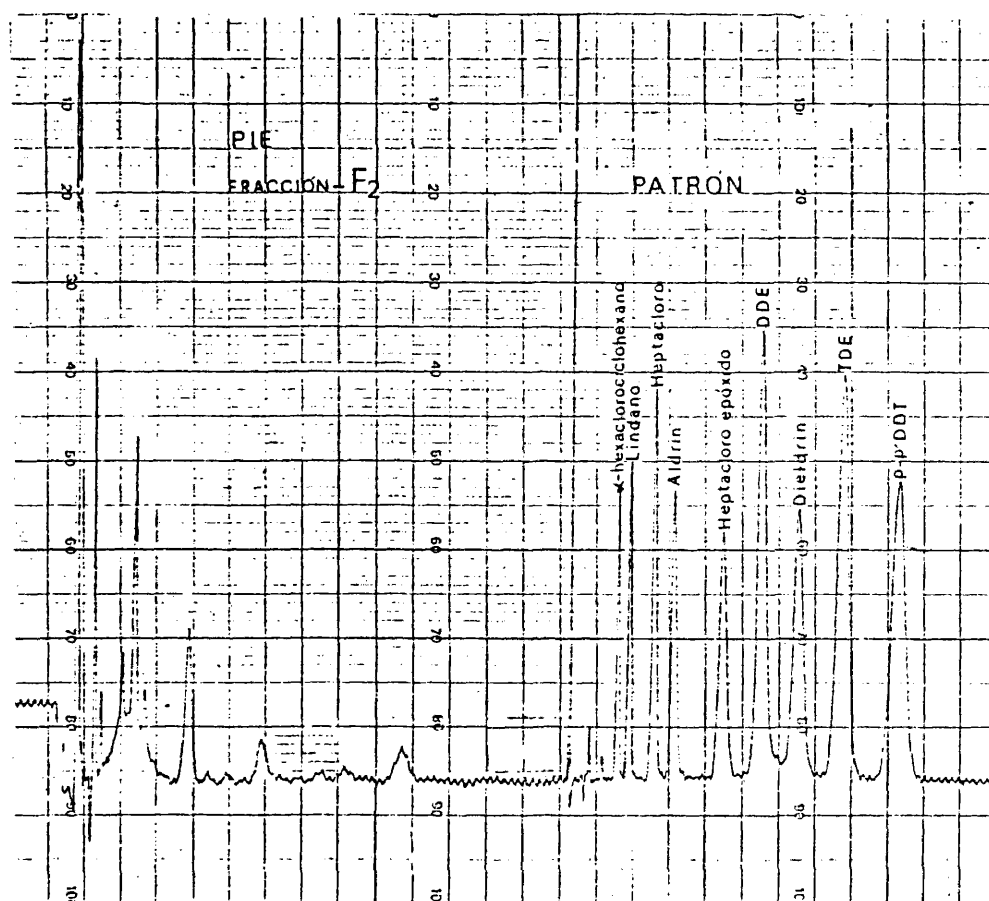


Figura 33 - Cromatogramas correspondientes a la fracción F2 de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.) y solución patrón de diversos insecticidas organoclorados.

lindano 0,05 μ g/g. de tejido fresco (ppm.), valores medios correspondientes a tres determinaciones.

Como cada gramo de pie de mejillón, podría contener 0,05 ppm. como máximo de insecticida organoclorado, la cantidad presente en el extracto enzimático usado en las determinaciones de actividad enzimática (50 μ l.) correspondería a 0,0002 ppm, cantidad que puede considerarse despreciable frente a la puesta por nosotros en cubeta en los ensayos realizados.

Se tiene evidencia según SIMAL y col. (1971) y BOADO y col. (1975), que los moluscos, sobre todo el mejillón son capaces de concentrar al menos 1000 veces el contenido en dieldrín de las aguas en que viven; experimentos llevados a cabo por estos autores en los que pudieron comprobar que para concentraciones incluso tan bajas como décimas de partes por billón, en el medio ambiente, los moluscos llegan a acumular varias ppm. en pocos días, les lleva a poder emitir tal conclusión.

Los mismos autores han podido comprobar la fuerte resistencia de estos moluscos a la eliminación del dieldrín en mejillones contaminados y que ésta aunque es posible, requiere bastante tiempo, ya que durante su período de observación (algo más de dos meses), no sólo no desapareció totalmente la contaminación sino que se mantuvo en un cierto nivel.

Estas consideraciones juntamente con la existencia de insec

ticidas organoclorados en mejillón subrayan la importancia que puede tener la investigación del efecto sobre el metabolismo animal, en este caso concreto el mejillón, de estos insecticidas organoclorados que en condiciones extremas pueden acumularse en cantidades tales que ejerciesen "in vivo" algunas alteraciones metabólicas.

3.2.2. INVESTIGACION DE LA INFLUENCIA DE INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA.

Empleando las condiciones de ensayo ya especificadas (2.2.13), se estimó la influencia de diversos insecticidas organoclorados sobre la actividad de la piruvatoquinasa de pie de mejillón. El insecticida organoclorado se añadía a la mezcla de reacción en un pequeño volumen de un disolvente orgánico.

Es conocido (ANDERS, 1968), la influencia que algunos de estos disolventes orgánicos ejercen sobre la actividad de diferentes enzimas, por lo que se realizaron experimentos para determinar el posible efecto del disolvente sobre la actividad de la piruvatoquinasa.

3.2.2.1. Efecto del disolvente.

El disolvente usado en principio fue la acetona. A la mezcla de reacción preparada según se indicó en el apartado de determinación de la actividad enzimática, se añade acetona en cantidades que varían de 0,025 mM. a 0,5 mM. y con concentración fija y saturante de PEP.

Los resultados ponen de manifiesto que el efecto que la acetona ejerce sobre la actividad de la enzima es el mismo a partir de una concentración 0,025 mM.

Fijada de esta manera una concentración de acetona, se estudió su efecto a varias concentraciones de PEP (0,05 mM a 1,5 mM.) con extracto crudo y extracto parcialmente purificado, observándose en los dos casos un comportamiento similar.

La figura 34 muestra el efecto de la acetona sobre la piruvatoquinasa de pie de mejillón en extracto parcialmente purificado (comprobándose el mismo efecto en 5 experimentos). Aunque este efecto no es muy pronunciado, se puede observar que la acetona influye tanto en el valor de la velocidad máxima como en el de la $K_{SO,5}$ para PEP, observándose además un efecto activador a altas concentraciones de PEP y un efecto inhibidor a bajas concentraciones de este sustrato.

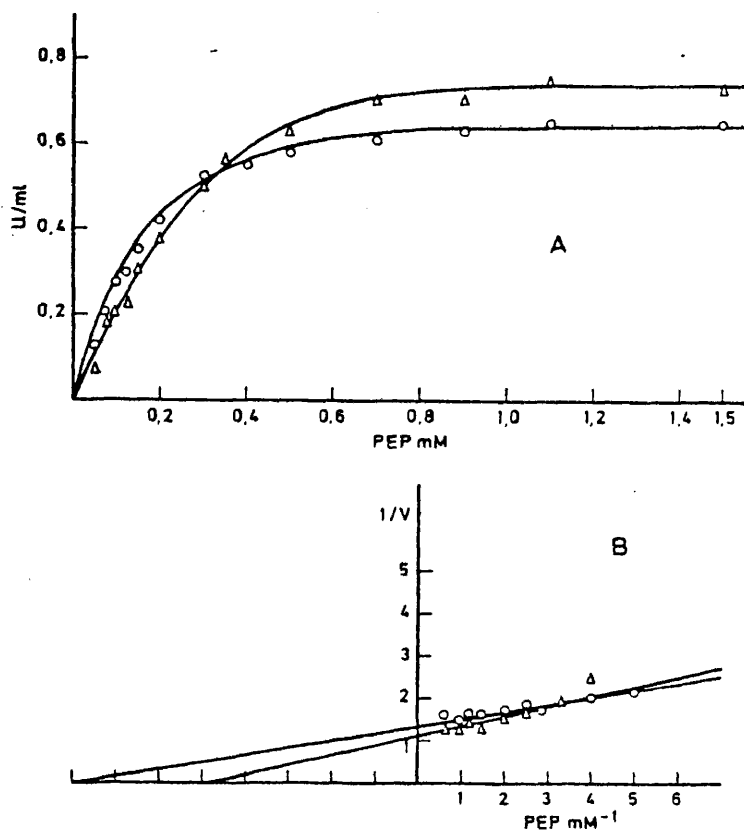


Figura 34 - Efecto de la acetona en la actividad de la piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

○ Control (PEP)

△ En presencia de Acetona

Pensando en la posible existencia en el extracto de una acetona reductasa, que en las condiciones en que se encuentra activada pudiese actuar:

$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{acetona} \longrightarrow \text{NADH}^+ + \text{CH}_3\text{-CHOH-CH}_3$ ó un producto de ulterior reducción, se realizaron pruebas poniendo en la mezcla de reacción todos los productos a las mismas concentraciones indicadas (2.2.2.) excepto PEP y LDH. En estas condiciones no se pudo detectar variación alguna en la absorbancia correspondiente al NADH a 340 nm., en el transcurso del tiempo.

Otra posibilidad, aunque muy remota, podía ser la transformación de la acetona en un compuesto más oxidado con la consiguiente producción de NADH, lo que explicaría la disminución de actividad encontrada a concentraciones bajas de PEP. Se hicieron ensayos poniendo en cubeta todos los reactivos menos ADP, PEP y sin extracto enzimático en un caso y en presencia de extracto en otro. Ninguno de los ensayos dió resultado positivo al no observarse variación en la absorbancia debida al NADH en el transcurso del tiempo.

El encuentro de que la $K_{50,5}$ de la piruvatoquinasa varía con la presencia de acetona, sugiere que el mecanismo no puede ser explicado por un sencillo incremento en la cantidad de enzima con las mismas propiedades cinéticas, quizás debido a alteraciones estructurales inducidas por la acetona.

Una posible explicación aceptable a esto, podría ser el

sugerir como ANDERS (1968) la presencia de isoenzimas con diferentes propiedades cinéticas. Sin embargo este no es el caso en nuestros ensayos ya que no se ha detectado en nuestros experimentos, la existencia de formas isoenzimáticas de piruvatoquinasa de pie de millón (3.1.4.).

Como ya conocíamos el efecto activador ejercido por la FbP sobre la piruvatoquinasa, se estudió el efecto que ejercía la acetona en presencia de FbP. Los resultados obtenidos por la presencia de estos dos compuestos sobre la velocidad de reacción de la piruvatoquinasa se pueden observar en la figura 35.

El hecho de que la FbP cambia la cinética de sigmoidal a hiperbólica manifestando a todas las concentraciones de PEP un aumento de la actividad de la piruvatoquinasa, pero incluso un aumento mayor a aquellas concentraciones en que la acetona inhibe, y dado además que la acetona aumenta el perfil sigmoidal de la curva de saturación de PEP, sugería que los dos compuestos, producen sus efectos de una forma diferente.

Por otro lado si la acetona y la FbP actuaran de una forma similar no sería posible producir un aumento adicional con FbP en presencia de la concentración de acetona que da la máxima actividad. En nuestro caso la FbP es capaz de activar la piruvatoquinasa en presencia de acetona, lo que indica que la activación producida por la FbP y la acetona tienen que obedecer a mecanismos diferentes.

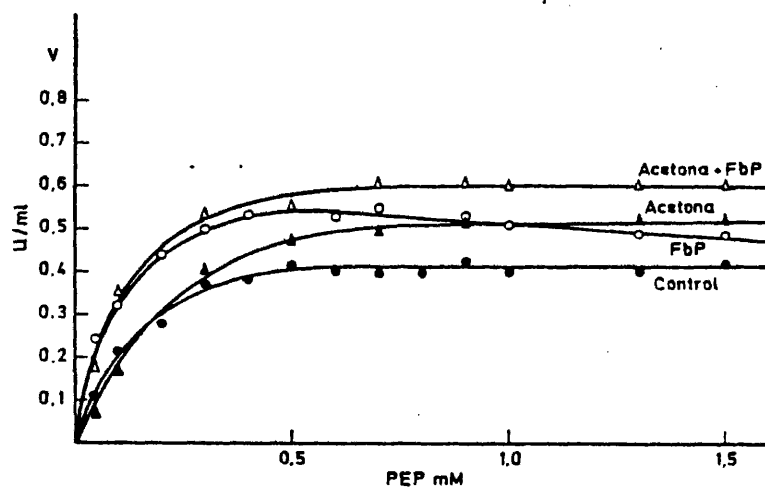


Figura 35 - Representaciones de Michaelis-Menten para la actividad de piruvatoquinasa en presencia de distintos efectores en pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

- Control (PEP)
- En presencia de Fructosa-1,6-bifosfato
- ▲ En presencia de acetona
- △ En presencia de Fructosa-1,6-bifosfato y acetona

En virtud de estas alteraciones cinéticas provocadas por la acetona, que se podría emplear como disolvente del insecticida, se decidió descartar el empleo de este disolvente en los experimentos posteriores a fin de no introducir variables que dificultasen la interpretación de los resultados con insecticidas organoclorados. En consecuencia se usó el etanol una vez comprobado que en las concentraciones que iban a ser utilizadas al emplearse como disolvente del insecticida organoclorado, no afectaba las propiedades cinéticas de la enzima.

3.2.2.2. Efecto del aldrín, dieldrín, endrín, lindano y p,p'-DDT.

Los ensayos cromatográficos pusieron de manifiesto en pie de mejillón, solamente la existencia de aldrín y lindano. Puesto que existen análogos estructurales del aldrín (dieldrín y endrín) y otros tipos de insecticidas organoclorados cuyos residuos han sido detectados en esta especie animal, en una primera aproximación hemos intentado poner de manifiesto el efecto de estos compuestos sobre la actividad de la piruvatoquinasa, realizando ensayos "in vitro" a distintas concentraciones de los mismos. Los resultados muestran que a las concentraciones indicadas la piruvatoquinasa es inhibida por todos los insecticidas organoclorados ensayados excepto el lindano.

Los resultados se expresan en las figuras 36 y 37 y en la tabla VIII, donde se expone la inhibición de la piruvatoquinasa en función de la concentración del insecticida organoclorado. Conocido el efecto de la cantidad de proteína en cubeta sobre la influencia de estos insecticidas en la actividad de la piruvatoquinasa (véase 3.2.2.3.) se usó en todas las determinaciones una cantidad de extracto enzimático dentro de la zona donde es notable la inhibición por el insecticida.

La figura 36 (A), indica que el dieldrín a una concentración 0,28 mM. en cubeta, ya ejerce un efecto inhibitor de aproximadamente 50 por 100 y una concentración doble ejerce prácticamente el mismo efecto. La constancia en el poder inhibitor de este compuesto a las concentraciones indicadas, podría explicarse por las propiedades de solubilidad del compuesto organoclorado, que a partir de una determinada concentración puede producir una saturación en la mezcla de reacción, siendo entonces accesible a la enzima la misma cantidad de este insecticida en ambas concentraciones.

Estos datos nos han conducido a emplear la mínima concentración que ejerce el máximo efecto inhibitor en las investigaciones sucesivas realizadas con este compuesto acerca de su influencia sobre las constantes cinéticas de la enzima.

En la gráfica (B) de la figura 36, se expresa el efecto del aldrín, mostrando que hasta la concentración de 0,25 mM. esta sustancia ejerce una inhibición creciente sobre la actividad de la

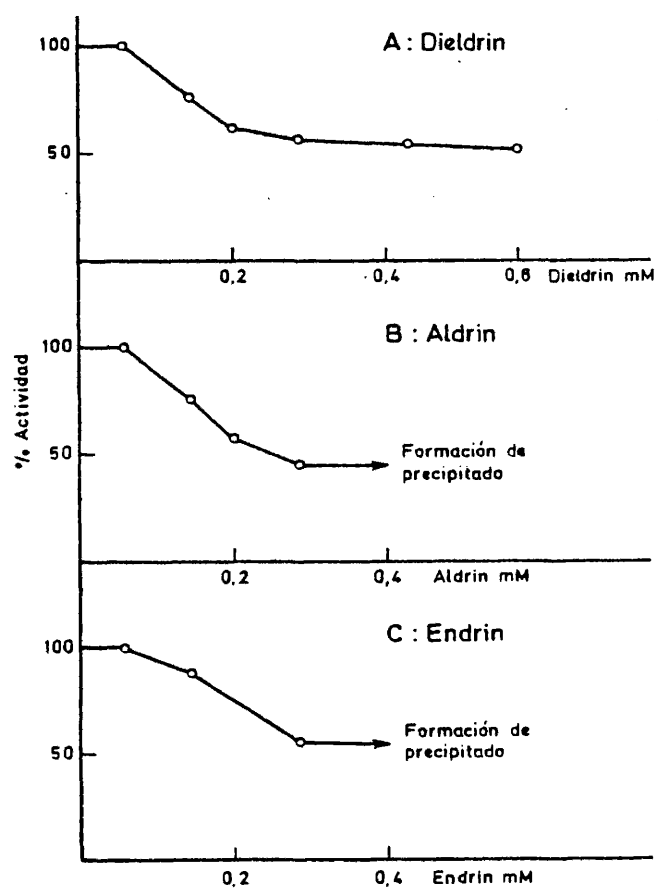


Figura 36 - Efecto de dieldrín (A), aldrín (B) y endrín (C) sobre la actividad de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

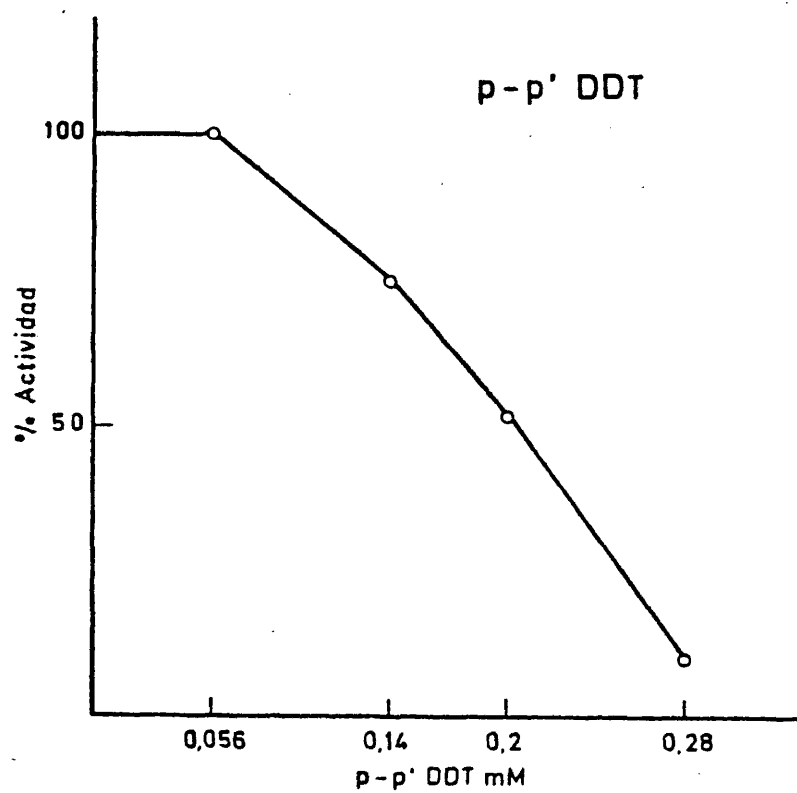


Figura 37 - Efecto de p,p'-DDT sobre la actividad de piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

TABLA VIII.- EFECTO DEL LINDANO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PIRUVATOQUINASA DE PIE
DE MEJILLON.

| Proteínas (mg/ml.) | Lindano (mM.) | PEP (mM.) | Actividad residual (%) |
|--------------------|---------------|-----------|------------------------|
| 0,074 | ---- | 1,5 | 100 |
| 0,074 | 0,17 | 1,5 | 98 |
| 0,037 | ---- | 1,5 | 100 |
| 0,037 | 0,17 | 1,5 | 98 |
| 0,037 | 0,34 | 1,5 | 100 |
| 0,037 | 0,68 | 1,5 | 96 |
| 0,037 | ---- | 0,15 | 100 |
| 0,037 | 0,34 | 0,15 | 87 |

enzima.

Con respecto al endrín (esteroisómero del diel-drín), como se puede observar en la gráfica (C) de la figura 36, la inhibición también es creciente en función de la concentración y llega a ser máxima a 0,28 mM. y del mismo orden que la encontrada para el diel-drín, lo que está de acuerdo con su analogía estructural.

En la figura 37, se expresa el comportamiento de la piruvatoquinasa de pie de mejillón frente a concentraciones crecientes de otro tipo de compuesto organoclorado como es el caso del p,p'-DDT. Con este insecticida la máxima inhibición encontrada corresponde a

una concentración de este compuesto de 0,28 mM. con una intensidad de un 90 por 100.

En todos los casos descritos de inhibición de la enzima por los insecticidas organoclorados mencionados, no fué posible aumentar las concentraciones de éstos para poder investigar su efecto, debido a limitaciones de solubilidad que provocaban la aparición de un precipitado en la mezcla de reacción que impedía las medidas espectrofotométricas de actividad enzimática.

Como se ha indicado anteriormente el lindano prácticamente no ejerce efecto sobre la actividad de la piruvatoquinasa. Con el fin de ahondar algo más en el problema, se han variado las concentraciones de proteína, insecticida y PEP en la mezcla de reacción. En la tabla VIII, se muestran los resultados obtenidos en estas pruebas.

TABLA IX.- VALORES DE I_{50} DE DIVERSOS INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS PARA PIRUVATO-
QUINASA DE PIE DE MEJILLON.

| Insecticida organoclorado | I_{50} |
|---------------------------|----------|
| Dieldrín | 0,28 |
| Aldrín | 0,25 |
| Endrín | 0,27 |
| p,p'-DDT | 0,20 |

Los valores de I_{50} , es decir las concentraciones de inhibidor que produce el 50 por 100 de inhibición, han sido calculados a partir de las gráficas anteriores. Los valores se expresan en la tabla IX, donde se puede observar que el p,p'-DDT tiene el menor valor de I_{50} , lo que indica su mayor efecto inhibidor. Los valores correspondientes a los restantes insecticidas inhibidores de la enzima que muestran un menor efecto inhibidor son muy similares.

A la vista de los resultados obtenidos, expresados por su valor de I_{50} , es interesante establecer una relación estructura-actividad.

La determinación de actividad enzimática, ha sido usada como medio de evaluación de insecticidas y se ha podido ver la relación entre el efecto producido por algunos insecticidas y su estructura química (SADAR y GUILBAULT, 1971). Estos autores encuentran que la hexoquinasa de levadura es inhibida selectivamente por ciertos insecticidas organoclorados, indicando que la enzima tiene un sitio activo capaz de distinguir inhibidores químicamente similares. Encuentran que el DDT es el compuesto organoclorado más activo de todos los examinados y que cuando se sustituye en el DDT los átomos en la posición "para" por grupos $-O-CH_3$, se produce un compuesto que manifiesta solamente la mitad del poder inhibidor encontrado con DDT. DDD y DDE o manifiestan poder inhibidor, lo que sugiere que la porción alifática del DDT tiene un papel importante, pues reemplazando un átomo de cloro o eliminando una molécula de HCl y creando un doble enlace, las propiedades inhibidoras, disminuyen sensiblemente. Según los mis

mos autores el aldrín inhibe fuertemente a dicha enzima, mostrando el dieldrín y endrín menos poder inhibidor debido a la formación del epóxido.

Los resultados encontrados por nosotros, indicados anteriormente, muestran una gran concordancia con los citados por los autores antes mencionados, lo cual parece indicar que el mecanismo de la acción inhibidora de estos insecticidas organoclorados sobre la piruvatoquinasa de pie de mejillón puede ser análogo al que opera en hexoquinasa de levadura.

3.2.2.3. Efecto de la cantidad de proteína en la inhibición producida por el dieldrín.

Una vez conocido el efecto de distintos factores que pueden intervenir en la reacción enzimática, como el efecto del disolvente, concentración de insecticida, y los efectos ya señalados en el apartado 2.2.13. así como el efecto inhibidor de los insecticidas organoclorados sobre la actividad enzimática de la piruvatoquinasa, ha sido de interés explorar con concentraciones variables de proteína en cubeta, la influencia de una cantidad fija de insecticida en las condiciones óptimas de medida de la actividad enzimática.

Los resultados obtenidos se expresan en las gráficas correspondientes en la figura 38 (A), donde se puede observar que a una concentración 0,28 mM. del insecticida dieldrín y con cantidades de proteína que varían entre 0,035 mg. y 0,35 mg., a partir de una cantidad de 0,175 mg. de proteína en cubeta, el dieldrín a la concentración indicada no parece ejercer efecto inhibidor alguno.

Este sorprendente resultado se ha repetido en un segundo experimento empleando en vez de extracto crudo como en el caso anterior, una fracción parcialmente purificada de piruvatoquinasa de pie de mejillón. Los resultados parecen coincidir en líneas generales con los descritos anteriormente, aunque en este segundo caso con una cantidad de 0,074 mg de proteína en cubeta ya no se observa efecto inhibidor del insecticida.

Aunque estos resultados requerirían una investigación más a fondo, no era el objeto de nuestro trabajo ahondar en este problema ya que como se ha indicado anteriormente el objeto de estas experiencias consistía en establecer unas condiciones de relación enzima-insecticida organoclorado en las cuales fuese observable el efecto inhibidor, para en esas condiciones poder estudiar el mecanismo de dicho efecto.

La posible interpretación de los resultados obtenidos con respecto a la desaparición de la inhibición con las cantidades de proteína ya indicadas resulta difícil, ya que no tenemos datos adicionales que nos ayuden a establecer un razonamiento lógico. Se podría indicar en términos generales que dado que el dieldrín presen-

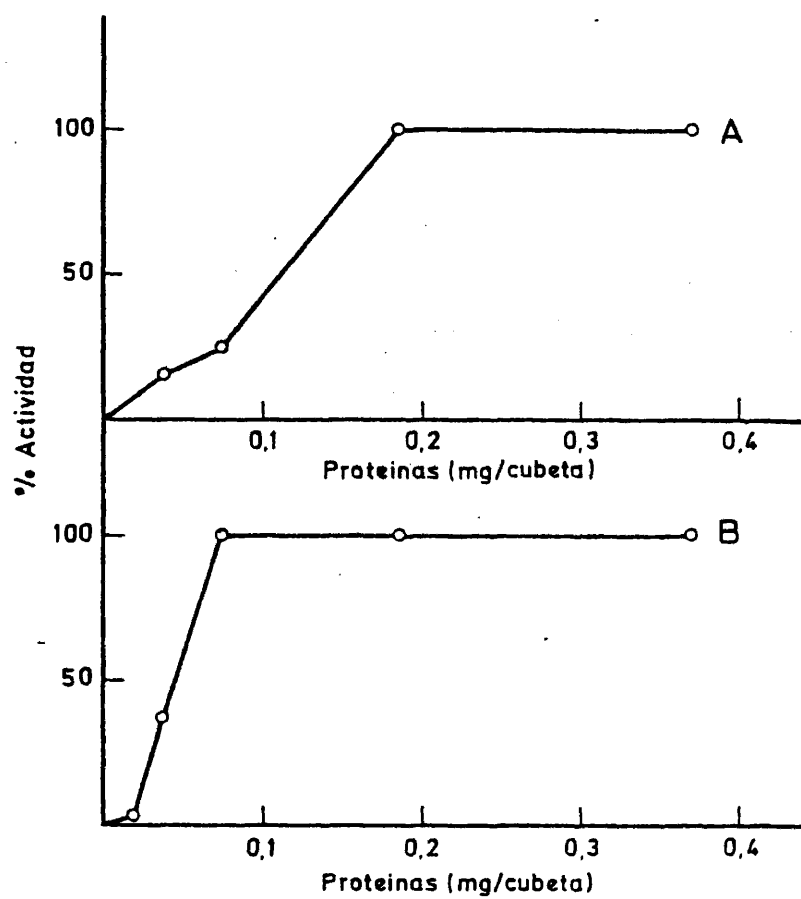


Figura 38 - Efecto de la cantidad de protefina en cubeta sobre la influencia producida por el dieldrín

ta grupos con cierta polaridad podrían ser éstos los responsables de una cierta afinidad por determinados grupos polares de las proteínas que condujeran a la formación de determinados complejos insecticida-proteína, disminuyendo o haciendo desaparecer así la cantidad de insecticida libre susceptible de unirse a los centros activos de la molécula de la piruvatoquinasa objeto de estudio.

Aunque la concentración de proteína en cubeta, podría ser considerada despreciable frente a las concentraciones de sustrato e inhibidor, hay que tener en cuenta que en el caso de los insecticidas organoclorados, la concentración activa de estos puede ser también muy baja debido a su escasa solubilidad en medio acuoso.

Sin embargo resulta chocante que cuando se emplea la enzima parcialmente purificada la eliminación del efecto inhibidor del insecticida se realiza con una cantidad menor de proteína. Estos datos parecen indicar que determinados grupos funcionales de la PK tengan de alguna manera más afinidad que otras proteínas, si bien tampoco se ha de tomar este dato muy en cuenta ya que como se indicó en el apartado 3.1.1.4. el grado de purificación de la fracción empleada es aproximadamente 4 veces.

Los datos bibliográficos consultados en relación con este fenómeno descrito sobre la relación cantidad de insecticida-cantidad de proteína (enzima) en la mezcla de reacción, respecto al efecto inhibidor del insecticida han mostrado resultados análogos. GUILBAULT y SADAR (1969), estudiando el efecto de diversos insecticidas

organoclorados sobre la inhibición de lipasas, encuentra que a altas concentraciones de lipasa el efecto inhibidor del aldrín disminuye un 50 por 100 en relación al obtenido en presencia de una cantidad diez veces menor de enzima. Sin embargo estos autores no dan una explicación físico-química de tal fenómeno.

3.2.3. EFECTO DEL DIELDRIN EN LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA ENZIMA.

De los insecticidas detectados por nosotros en pie de mejillón: aldrín y lindano, es el aldrín el que manifiesta poder inhibidor frente a la piruvatoquinasa de este órgano. Por tanto sería lógico realizar el estudio de la influencia de este compuesto en la cinética de esta enzima. Sin embargo hemos elegido el dieldrín para realizar las citadas investigaciones por varias razones:

- 1.- La mayor parte de los trabajos realizados con insecticidas organoclorados ciclodiénicos, citados en la bibliografía, sobre el metabolismo de carbohidratos se han realizado utilizando dieldrín (1.5.2.). Nuestros resultados con dieldrín podrían cooperar a un mejor esclarecimiento de este tema.
- 2.- Por su analogía estructural con el aldrín lo que puede

presuponer un mecanismo de acción sobre la enzima similar al que pudiera ejercer el aldrín (siendo su acción extrapolable a la acción de otros compuestos ciclodiénicos).

3.- Por ser el dieldrín el epóxido del aldrín y en base a la sugerencia de SOLOWAY (1965) que indica que son los epóxidos los compuestos activos (respecto a su acción insecticida) y que aquellos compuestos que pueden ser epoxidados manifiestan también acción insecticida.

4.- Finalmente, ha sido de interés investigar el efecto del dieldrín sobre la enzima en estudio, siguiendo una línea de investigación anteriormente comenzada en la Cátedra de Química (Facultad de Veterinaria de Madrid) en la que es el dieldrín el insecticida organoclorado empleado en un estudio sobre la acumulación de este compuesto en órganos de pollo.

3.2.3.1. Tipo de inhibición producida por el dieldrín.

Seleccionado el dieldrín por las razones ya indicadas se ha procedido al estudio de su efecto sobre la piruvatoquinasa de pie de mejillón en función de la concentración de PEP y con el fin de

establecer el tipo de inhibición producido por este compuesto en nuestros ensayos "in vitro".

Los resultados expuestos en la figura 39, indican que la inhibición producida por este compuesto es de tipo no competitivo. La presencia de dieldrín no afecta el valor de la $K_{SO,5}$ de la enzima respecto al sustrato PEP.

Por lo tanto el efecto del dieldrín es un efecto alostérico, ya que el caso de inhibición no competitiva en un sistema unireaccionante puede considerarse el ejemplo más simple de alosterismo (FROMM, 1975).

En la gráfica (B) de la figura 39, se han tomado aquellos valores de PEP y velocidad máxima que corresponden a la zona no sigmoidal de la curva, como lo hemos hecho anteriormente en los experimentos de caracterización de la enzima y del estudio del efecto de la alanina.

3.2.3.2. Efecto conjunto de dieldrín y Fructosa-1,6-bifosfato.

Conocido el efecto que la presencia de FbP ejerce sobre la inhibición producida por alanina, se realizaron experimentos pa-

195

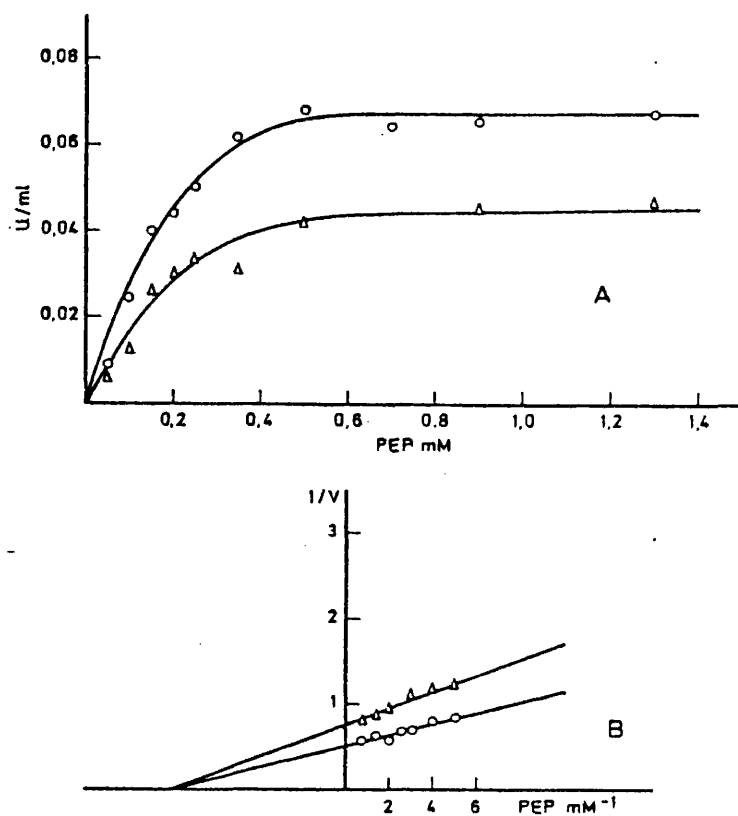


Figura 39 - Efecto del dieldrín en la actividad de la piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

○ Control (PEP)

△ En presencia de dieldrín

ra comprobar la posible influencia que este activador pudiera ejercer a su vez sobre el efecto producido por el dieldrín.

En la figura 40, se puede observar que el dieldrín inhibe no competitivamente a la enzima y la presencia de FbP no anula completamente esta inhibición, incluso a una concentración de FbP cuatro veces superior a la que anula la inhibición producida por alanina.

La velocidad máxima en presencia de dieldrín disminuye respecto al control y cuando junto con el dieldrín se añade FbP (0,4 mM.) no desaparece este efecto sobre la velocidad máxima. La presencia de FbP no influye prácticamente sobre la velocidad máxima en presencia del insecticida.

Estos datos permiten deducir que el efecto del dieldrín sobre la enzima es completamente independiente y parece obedecer a un mecanismo distinto al de la FbP como es lógico esperar dadas las diferencias químico estructurales de estos dos compuestos químicos tan dispares.

Para poder observar si la presencia del dieldrín afecta de alguna manera el comportamiento cinético de la enzima en presencia de FbP, se han determinado las $K_{SO,5}$ en presencia de FbP y de este compuesto más dieldrín. Los datos encontrados ponen de manifiesto una gran similitud entre ambos valores de $K_{SO,5}$, ya que en presencia de FbP la $K_{SO,5}$ para PEP tiene un valor de 0,065 mM. y en presencia

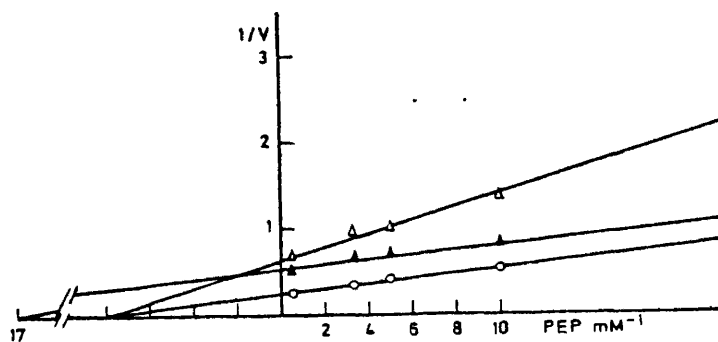


Figura 40 - Efecto del diethylamine y de diethylamine en presencia de Fructosa-1,6-bisfosfato en la actividad de la piruvatoquinasa de pie de mejillón (*Mytilus edulis* L.)

○ Control (PEP)

▲ En presencia de diethylamine

△ En presencia de diethylamine y Fructosa-1,6-bisfosfato.

cia de dieldrín más FbP el valor es de 0,070 mM.

3.2.3.3. Efecto de dieldrín en presencia de alanina y de alanina y fructosa-1,6-bifosfato.

El estudio de la influencia de otros efectores sobre la actividad de la piruvatoquinasa en presencia de dieldrín reviste gran interés en orden a comprobar si este insecticida actúa por el mismo mecanismo que los otros compuestos.

La alanina como es conocido y ya se ha indicado en nuestros resultados es un potente efecto negativo de la piruvatoquinasa, razón por la cual se ha estudiado su efecto en presencia del insecticida dieldrín.

La tabla X muestra los resultados obtenidos de varios ensayos realizados en las condiciones indicadas.

Los resultados expuestos en la tabla X corresponden a experimentos realizados con una cantidad máxima de proteína en cubeta de 0,05 mg., una concentración fija de FbP (0,4 mM.), de alanina (2 mM.) y una concentración fija y saturante de PEP (1,5 mM).

TABLA X.- EFECTO DE LA ADICION DE DIELDRIN SOBRE LA PIRUVATOQUINASA DE PIE DE MEJILLON EN PRESENCIA DE OTROS EFECTORES.

| Efectores | Actividad (Δ D.O./min.) | Inhibición (%) |
|---------------------|---------------------------------|----------------|
| ----- | 0,052 | ----- |
| FbP | 0,056 | ----- |
| Alanina | 0,027 | 48 |
| Alanina + FbP | 0,056 | ----- |
| Dieldrín | 0,015 | 70 |
| Dieldrín + FbP | 0,028 | 50 |
| ----- | 0,046 | ----- |
| Dieldrín + alanina | 0,014 | 70 |
| Diel. + Alan. + FbP | 0,017 | 40 |

3.2.4. EFECTO DEL TIEMPO DE CONTACTO DEL DIELDRIN CON LA ENZIMA A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Se utilizaron diferentes medios en presencia de 2-mercaptoetanol 3 mM. y 6 mM. y glicerol 30 por 100 (v/v), compuestos que como ya se ha indicado, actúan de forma positiva en el mantenimiento

de la estabilidad de la enzima, y en ellos se mantuvo el extracto enzimático a las temperaturas de + 20°C, + 4°C y - 20°C (congelado).

Para las medidas de - 20°C, para evitar alteraciones estructurales de la enzima por congelado y descongelado del medio, se pusieron tantos tubos como medidas a realizar. La proporción de diel_{dr}ín se puso de tal manera que al tomar una alícuota fuese en ella el insecticida organoclorado en la cantidad fijada en los ensayos enzimáticos en presencia de diel_{dr}ín, así como también la cantidad de proteína.

Los resultados de este efecto de la temperatura y el tiempo de contacto se pueden ver en las figuras 41, 42, 43 y 44, que corresponden a los cuatro medios utilizados y que se muestran en las gráficas correspondientes, expresadas como tanto por ciento de actividad residual, correspondiendo el cien por cien a una muestra sin incubar medida inmediatamente a la preparación del extracto enzimático.

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima puede resultar tan sorprendente que requiere una disección para su estudio con respecto a cada una de las temperaturas ensayadas.

+ 20°C.

Los resultados a + 20°C en presencia de diel_{dr}ín en los cuatro medios que se indican en las figuras 41, 42, 43 y 44, parece

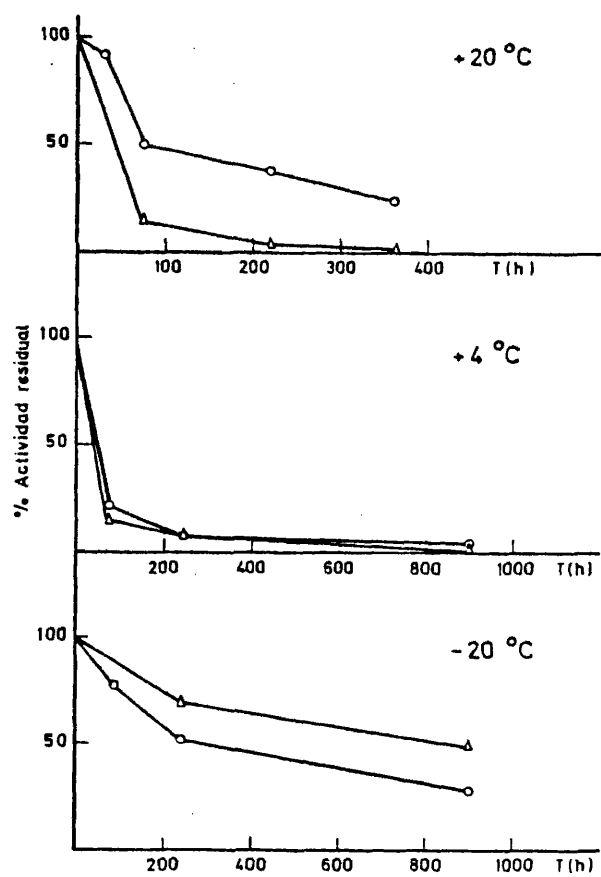


Figura 41 - Efecto del tiempo de contacto del dieldrin con la enzima, mentanidos en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM.

○ Control

△ En presencia de dieldrin

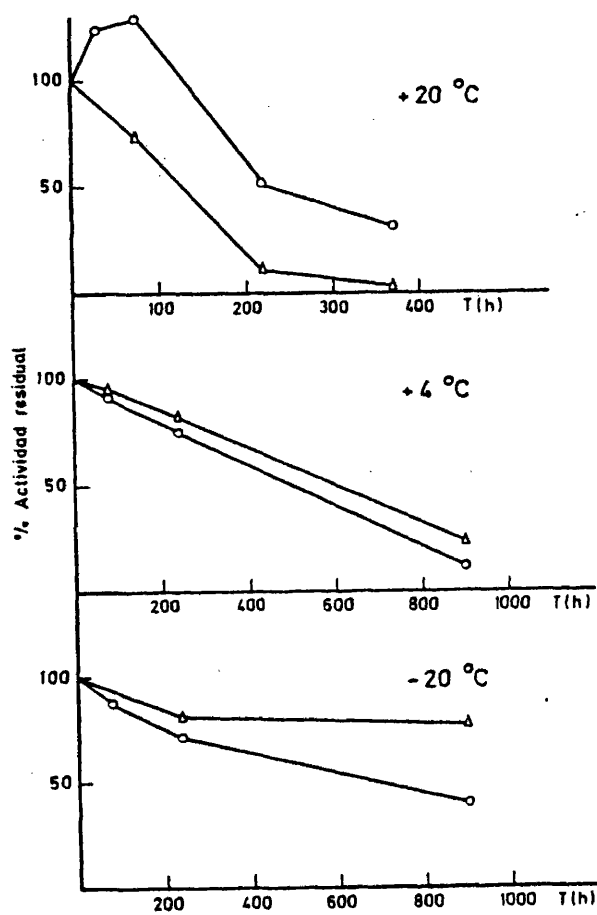


Figura 42 - Efecto del tiempo de contacto del dieldrín con la enzima, mantenidos en Tris-HCl 50 mM., pH 7,5, EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 3 mM.

○ Control

Δ En presencia de dieldrín

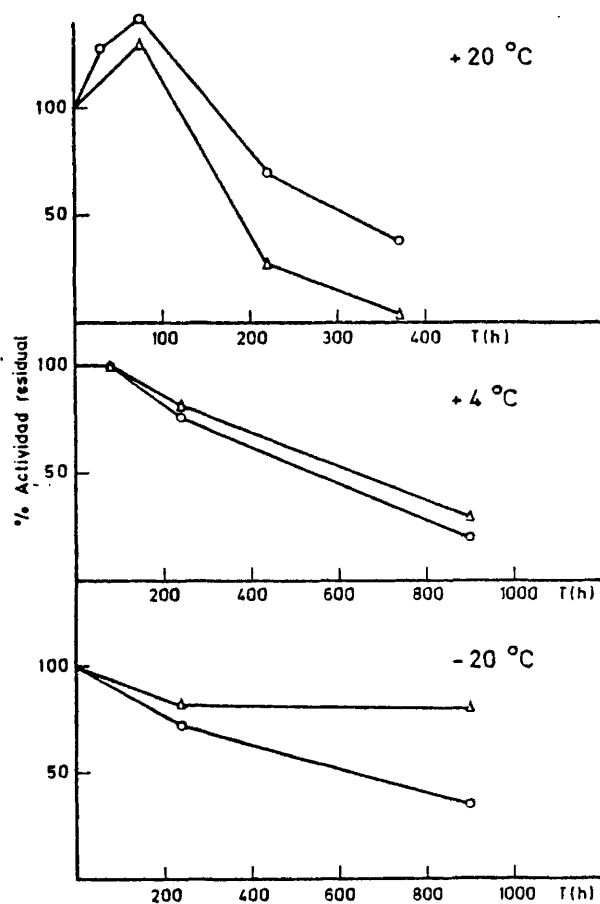


Figura 43 - Efecto del tiempo de contacto del diethylstilbestrol con la enzima, mantenidos en Tris-HCl 50 mM., pH 7,5, EDTA 1 mM. y 2-mercaptoetanol 6 mM.

○ Control

Δ En presencia de diethylstilbestrol

204

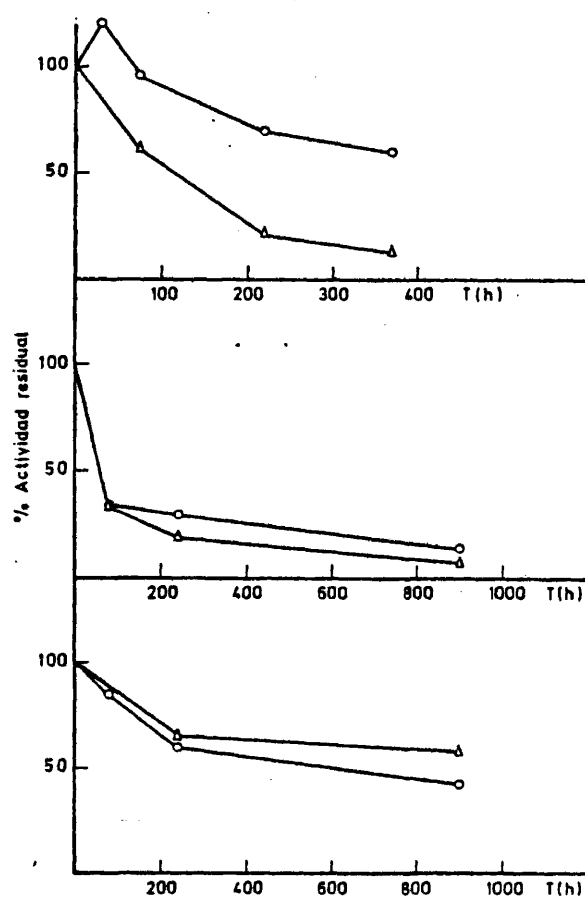


Figura 44 - Efecto del tiempo de contacto del dieldrín con la enzima, mantenidos en Tris-HCl 50 mM., pH 7,5, EDTA 1 mM., y glicerol 30 % (v/v).

o Control

Δ En presencia de dieldrín

mostrar que el efecto del dieldrín es el inhibidor referido anteriormente, puesto que aproximadamente desde los primeros tiempos de contacto de la enzima con el dieldrín se mantienen las mismas diferencias de actividad con respecto a los controles. Si además de este efecto inhibidor hubiese un efecto inactivador de la enzima por el insecticida las representaciones de los datos en ausencia y en presencia de dieldrín darían líneas que no serían paralelas, lo cual en líneas generales no parece ser el caso.

+ 4°C.

El efecto del dieldrín a la temperatura de + 4°C y en función del tiempo de contacto enzima-insecticida llama poderosamente la atención, ya que en todas las condiciones ensayadas no parecen existir diferencias significativas entre actividades residuales de la enzima tratada con dieldrín y las muestras controles. Estos hechos parecen indicar que a esa temperatura la presencia del dieldrín con extracto enzimático no afecta aparentemente la estabilidad ni la actividad enzimática.

Este hecho podría explicarse en base a que a + 4°C el dieldrín de alguna manera pierde su poder inhibidor, bien por una alteración de su estructura química (lo cual no parece ser probable dada la estabilidad de estos compuestos organoclorados) o por una menor disponibilidad de enzima activo sobre el que actuar.

- 20°C.

Más sorprendente aún resulta el hecho observado cuando se mantiene la enzima en presencia de dieldrín a la temperatura de - 20°C. La actividad residual encontrada en función del tiempo de conservación de la enzima es mayor en presencia de dieldrín que en su ausencia. Este hecho parece indicar que el dieldrín favorece de alguna manera una estructura enzimática más estable o desenmascara centros activos como parece deducirse de la divergencia de las líneas correspondientes a la representación de los valores control y en presencia del dieldrín con el tiempo.

207

4. CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES:

En el presente trabajo se han investigado los niveles de la piruvatoquinasa de pie de mejillón en relación con los que presentan otros órganos del citado molusco, así como las variaciones estacionales de esta enzima a lo largo del año. Así mismo se ha investigado el comportamiento cinético y la posible presencia de formas isoenzimáticas.

Por otra parte se ha estudiado la influencia de varios insecticidas organoclorados sobre la actividad de esta enzima de pie de mejillón.

Las conclusiones obtenidas son las siguientes:

- 1.- Los niveles de actividad piruvatoquinásica de pie de mejillón expresados en actividad específica muestran que en este órgano son notablemente superiores a aquellos que exhiben el manto y el hepatopáncreas.
- 2.- La enzima presenta variaciones estacionales en sus niveles a lo largo del año, alcanzando los más altos en julio. Este fenómeno puede estar relacionado con el ciclo reproductor del animal y con la disponibilidad de alimento.

- 3.- La enzima, parcialmente purificada por el tratamiento con sulfato amónico y posterior diálisis, muestra frente al pH una zona de máxima actividad comprendida entre los valores de 7,0 - 7,5. Con respecto a la estabilidad al pH dicha enzima es estable durante 15 minutos a 37°C en un margen comprendido entre 7,0 - 9,0.
- 4.- El estudio de la actividad enzimática frente a la temperatura ha permitido determinar el valor de la energía de activación de Arrhenius, resultando ser de 5.500 cal por mol (23.000 J por mol), así como el coeficiente de temperatura Q_{10} que alcanza un valor medio de 1,4.
- 5.- La piruvatoquinasa objeto de estudio, presenta cooperatividad positiva respecto al sustrato PEP como se pone de manifiesto por el valor del coeficiente de Hill ($h = 1,6$) y por la curvatura de la representación de Lineweaver-Burk, así como por el valor de R_s . En relación con estos estudios cinéticos se ha estimado un valor de $K_{S0,5}$ de 0,132 mM.
- 6.- Con respecto a las propiedades reguladoras de esta enzima, se ha encontrado activación por FbP e inhibición por alanina y ATP. La FbP provoca un cambio en la cinética de sigmoidal a hiperbólica, variando el coeficiente de Hill de 1,60 a 1,08, y alterando el valor de $K_{S0,5}$ de 0,132 mM. a 0,065 mM. La alanina por el contrario aumenta la coope-

ratividad del sustrato PEP elevando el coeficiente de Hill a $h = 2,10$ y la $K_{SO,5}$ a $0,370$ mM.

- 7.- Tanto la activación que experimenta la enzima por FbP como la inhibición por alanina y ATP son dependientes del pH. El efecto activador de la FbP y el inhibidor de la alanina y ATP resultan más acusados al pH más bajo ensayado (6,5).
- 8.- La investigación de posibles formas isoenzimáticas de piruvatoquinasa de pie de mejillón, no ha permitido detectar isoenzimas, aplicando las técnicas de cromatografía en columna con gel de Sephadex G-150, DEAE-Sephadex A-50 y por electroforesis en gel de poliacrilamida, así como mediante el estudio de la curva de inactivación térmica a temperatura constante.
- 9.- Investigado el efecto de un conjunto de insecticidas organoclorados sobre la actividad de la enzima en ensayos "in vitro", se ha puesto de manifiesto, que aldrín, dieldrín, endrín y p,p'-DDT presentan acción inhibidora. El lindano por el contrario no ejerce en los ensayos realizados efecto alguno.
- 10.- El dieldrín inhibe la enzima de forma no competitiva con un valor de $K_i = 0,4$ mM. La presencia de FbP a concentraciones incluso cuatro veces superiores a la que anula el

efecto de la alanina, no suprime el efecto inhibidor producido por el dieldrín. El efecto conjunto de alanina más dieldrín es aproximadamente igual al ejercido por el dieldrín

- 11.- En resumen, se puede concluir globalmente, que la piruvatoquinasa de pie de mejillón manifiesta propiedades similares a las encontradas por otros autores en manto y músculo aductor, con la salvedad de presentar una mayor afinidad por el sustrato PEP, por lo cual podemos establecer que esta enzima se puede incluir dentro de la clase isoenzimática "L", presente en hígado de mamífero.

La presencia de insecticidas organoclorados en mejillón permite deducir una posible alteración en el metabolismo glucídico por estos compuestos, habida cuenta el efecto inhibidor ejercido por los citados insecticidas organoclorados sobre la actividad de esta piruvatoquinasa en ensayos realizados "in vitro".

5. BIBLIOGRAFIA.

•

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- AGOSIN, M., FINE, B.C., SCARAMELLI, N., ILIVICRY, J. y ARAVENA, L. (1966). Comp. Biochem. Physiol. 19, 339.
- 2.- AHMAD, T.A. y CHAPLIN, A.E. (1979). Comp. Biochem. Physiol. 64B, 351.
- 3.- AKMAN, M.S. (1976). Ankara Univ. Vet. Fak. Derg. 23, 211.
- 4.- ANDERS, M.W. (1968). Arch. Biochem. Biophys. 126, 269.
- 5.- ATKINSON, D.E. (1971). En "Metabolic pathways" (ed. H.J. Vogel). Academic Press. New York and London. p. 1.
- 6.- BALUJA, G., FRANCO, J.M. y MURADO, M.A. (1973). Inves. Pesq. 37, 593.
- 7.- BALUJA, G., MURADO, M.A. y HERNANDEZ, L.M. (1977). Rev. Agroquim. Technol. Aliment. 17, 481.
- 8.- BAYNE, B.L. (1964). J. Anim. Ecol. 33, 513.
- 9.- BEDFORD, J.W. y ZABIK, M.J. (1973). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1, 97.

- 10.- BENNET, R. y NAKADA, H.I. (1968). Comp. Biochem. Physiol. 24, 787.
- 11.- BENSON, W.R. (1969). Ann. N.Y. Acad. Sci. 160, 7.
- 12.- BERNHARD, S.A. (1968). En "The Structure and Function of Enzymes". Benjamin, New York. p. 286.
- 13.- BHATIA, S.C., SHARMA, S.C., DAMODARAN, V.N. y VENKITASUBRAMANIAN, T.A. (1971). Indian J. Biochem. Biophys. 8, 57.
- 14.- BHATIA, S.C., SHARMA, S.C. y VENKITASUBRAMANIAN, T.A. (1972 a). Arch. Environ. Health. 24, 369.
- 15.- BHATIA, S.C., SHARMA, S.C. y VENKITASUBRAMANIAN, T.A. (1972 b). Brit. J. Exp. Pathol. 53, 419.
- 16.- BHATIA, S.C., SHARMA, S.C. y VENKITASUBRAMANIAN, T.A. (1973). Toxicol. Appl. Pharmacol. 24, 216.
- 17.- BLACK, J.A. y HENDERSON, M.H. (1972). Biochim. Biophys. Acta 284, 115.
- 18.- BOADO, A., SIMAL, J., CHARRO, A. y CREUS, J.M. (1975). Anal. Bromatol. 27, 63.
- 19.- BOCK, P.E. y FRIEDEN, C. (1978). TIBS 3, 100.

- 20.- BRODTMAN, N.V. (1970). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 5, 455.
- 21.- BUCHER, T. y PFLEIDERER, G. (1955). En "Methods in Enzymology" (ed. S. P. Colowick y N. O. Kaplan). Academic Press. New York. 1, 435.
- 22.- BUTLER, P. A. (1965). En "Biological Problems in water pollution, third seminar (1962)". p. 92. USPHS Publication No 999-WP-25.
- 23.- BUTLER, P. A. (1966). Am. Fish. Soc. Spec. Publ. 3, 110.
- 24.- BUTLER, P.A. (1971). Proc. R. Soc. London, Ser. B, 177, 321.
- 25.- BUTLER, P.A. (1973). Pestic. Monit. J. 6, 238.
- 26.- CAMESELLE, J.C., SANCHEZ, J.L. y CARRION, A. (1980). Comp. Biochem. Physiol. 65B, 95.
- 27.- CARBONELL, J., FELIU, J.E., MARCO, R. y SOLS, A. (1973). Eur. J. Biochem. 37, 148
- 28.- CHEN, C. y AWAPARA, J. (1969). Comp. Biochem. Physiol. 30, 727.

- 29.- CORNISH, A. S. y JOHNSON, E. J. (1971). Arch. Biochem. Biophys. 142, 584.
- 30.- CRAPP, G. B. (1971). En "The ecological effects of oil pollution on littoral communities" (ed. E.B. Cowell). Elsevier, Amsterdam. p. 129.
- 31.- CRISP, D.J. (1975). En "Perspectives in experimental biology" (ed. P. Spencer Davies). Pergamon Press. Oxford. vol. I.
- 32.- DAVIS, H. C. (1961). Commer. Fish. Rev. 23, 8.
- 33.- DAVIS, B. J. (1964). Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404.
- 34.- DE ZWAAN, A. (1972). Comp. Biochem. Physiol. 42B, 7.
- 35.- DE ZWAAN, A. y DE BONT, A.M.Th. (1975). J. Comp. Physiol. 96, 85.
- 36.- DE ZWAAN, A., DE BONT, A.M.Th., KLUYTMANS, J.H.F.M. (1975). En "Proceedings of the ninth European marine biology symposium" (ed. H. Barnes). Aberdeen University Press. Aberdeen. p. 121.
- 37.- DE ZWAAN, A. y HOLWERDA, D. A. (1972). Biochem. Biophys. Acta 276, 430.

- 38.- DE ZWAAN, A. y VAN MARREWIJK, W.J.A. (1973 a). Comp. Biochem. Physiol. 44B, 429.
- 39.- DE ZWAAN, A. y VAN MARREWIJK, W. J. A. (1973 b). Comp. Biochem. Physiol. 44B, 1057.
- 40.- DE ZWAAN, A., VAN MARREWIJK, W.J.A. y HOLWERDA, D.A. (1973). Neth. J. Zool. 23, 225.
- 41.- DE ZWAAN, A. y WIJSMAN, T.C.M. (1976). Comp. Biochem. Physiol. 54B, 313.
- 42.- DE ZWAAN, A. y ZANDEE, D.I. (1972 a). Comp. Biochem. Physiol. 43A, 53.
- 43.- DE ZWAAN, A. y ZANDEE, D.I. (1972 b). Comp. Biochem. Physiol. 43B, 47.
- 44.- DIKSHITH, T.S.S. (1978). J. Sci. Ind. Res. 37, 316.
- 45.- EADES, J.F. (1975). Comm. Eur. Communities, (Rep) EUR. EUR 5196. Probl. Raised Contam. Man Environ. Persistent Pestic. Organo-Halogenated Compds., p. 175.
- 46.- EBBERINK, R.H.M., DE ZWAAN, A. y WIJSMAN, T.C.M. (1976). Biochem. Soc. Trans. 4, 444.

- 47.- ENGEL, R.H. y NEAT, M.J. (1970). Comp. Biochem. Physiol. 37, 397.
- 48.- ENGEL, R.H., NEAT, M.J. y HILLMAN, R.E. (1972). En "Marine pollution and sea Life", Fishing News (Books) Ltd, London, p. 257.
- 49.- ERNST, W. (1975). Chemosfere, 4, 375.
- 50.- FAO (1972)., Yearbook of fishery statistics, 1971. Food and Agricultural organisation. Rome.
- 51.- FARAGO, A. y DENES, G. (1967). Biochem. Biophys. Acta 139, 521.
- 52.- FERNANDEZ MEDRANO, M.J., RUIZ-AMIL, M. y LOSADA, M. (1967). Eur. J. Biochem. 3, 11.
- 53.- FOSSATO, H. y SIVIERO, J. (1974). Mar. Biol. 25, 1.
- 54.- FRASER, D. I., DYER, W.J., WEINSTEIN, H.M., DINGLE, J.R. y HINES, J.A. (1966). Can. J. Biochem. 44, 1015.
- 55.- FRIEDEN, C. (1970). J. Biol. Chem. 245, 5788.
- 56.- FRIEDEN, C. (1979). Ann. Rev. Biochem. 48, 471.

- 57.- FROMM, H.J. (1975). En "Initial Rate Enzyme Kinetics" (ed. A. Klenizeller, G.F. Springer y H.G. Wittmann). Springer-Verlag Berlin. p. 236.
- 58.- GABBOTT, P.A. y BAYNE, B.L. (1973). J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 53, 269.
- 59.- GABBOTT, P.A. (1976). En "Marine mussels: their ecology and physiology" (ed. B.L. Bayne). Cambridge University Press. p. 293.
- 60.- GADE, G. y ZEBE, E. (1973). J. Comp. Physiol. 85, 291.
- 61.- GEIKE, F. (1978). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 20, 640.
- 62.- GLOTFELTY, D.W. (1978). J. Air. Pollut. Control. Assoc. 28, 917.
- 63.- GOLDBERG, E.D., BOWEN, V.T., FARRINGTON, J.W., HARVEY, G., MARTIN, J.H., PARKER, P.L., RISEBROUGH, R.W., ROBERTSON, W., SCHNEIDER, E. y GAMBLE, E. (1978). Environ. Conserv. 5, 101.
- 64.- GONCZI, Cs., HOLLO, A., PASZTOR, Zs. y PONYI, J. (1978). Hichol. Kozl. 58, 519.
- 65.- GRANT, B.F. y MEHRLE, P.M. (1973). J. Fish. Res. Board Can. 27, 2225.

- 66.- GUILBAULT, G.G. y SADAR, M.H. (1969). Anal. Chem. 41, 366.
- 67.- HAECKEL, R., HESS, B., LAUTERBORN, W. y WUSTER, K.H. (1968) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349. 699.
- 68.- HAMMEN, C.S. (1969). Am Zool. 9, 309.
- 69.- HAMMEN, C.S. (1975). Comp. Biochem. Physiol. 50B, 407.
- (70.- HANSON, J. y LOWY, J. (1960). En "Structure and Function of Muscle" Academic Press. New York. 1, 265.
- 71.- HATWAY, D. E. (1965). Arch. Environ. Health. 11, 380.
- 72.- HIDAKA, R. (1972). Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 13, 523.
- 73.- HIDU, H. y DAVIS, H.C. (1969). Fish. Bull. U.S. Fish and Wildl. Serv. 67, 393.
- (74.- HILL, A. V. (1910). J. Physiol. (Lond.) 40, iv.
- 75.- HOCHACHKA, P.W. y MUSTAFA, T. (1972). Science 178, 1056.
- 76.- HOCHACHKA, P.W., FIELDS, J. y MUSTAFA, T. (1973). Am. Zool. 13, 543.

- 77.- HOLWERDA, D.A. y DE ZWAAN, A. (1973). Biochem. Biophys, Acta 309, 296.
- 78.- HOLWERDA, D.A., DE ZWAAN, A. y VAN MARREWIJK, W.J.A. (1973). Neth. J. Zool. 23, 232.
- 79.- HORECKER, B.L. y KORNBERG, G.A. (1948). Biol. Chem. 175, 385.
- 80.- HOYLE, G. (1957). En "Comparative Physiology of Muscular Contraction" Cambridge Univ. Press. London and New York. p. 147.
- 81.- IDE, M. (1970). Arch. Biochem. Biophys. 140, 408.
- 82.- IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature. (1971). Eur. J. Biochem. 24, 1.
- 83.- JACOBSON, K.W. y BLACK, J.A. (1971). J. Biol. Chem. 264, 5504.
- 84.- J. CHROMATOG. science (1975). 13, 201.
- 85.- KACEW, S. y SINGHAL, R.L. (1973). Biochem. Pharmacol. 22, 47.
- 86.- KACEW, S. y SINGHAL, R.L. (1974). Biochem. J. 142, 145.

- 107.- LLORENTE, P., MARCO, R. y SOLS, A. (1970). Eur. J. Biochem. 13, 45.
- 108.- MAHLER, H.R. y CORDES, E.H. (1971). En "Biological Chemistry". Harper y Row. New York. p. 231.
- 109.- MALANGA, C.J. y AIELLO, E.L. (1972). Comp. Biochem. Physiol. 43B, 795.
- 110.- MALCOVATTI, M. y KORNBERG, H.L. (1969). Biochem. Biophys. Acta 178, 420.
- 111.- MARCO, R., CARBONELL, J. y LLORENTE, P. (1971). Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 126.
- 112.- MASON, J. (1976). En "Marine mussels: their ecology and physiology" (ed. B.L. Bayne). Cambridge University Press. p. 385.
- 113.- MASON, H.S., NORT, J.C. y VANNESTE, M. (1965). Fed. Proc. 24, 1172.
- 114.- MERSMANN, H.J. y SEGAL, H.L. (1967). Proc. Nat. Acad. Sci. US. 58, 1688.
- 115.- MILLS, P.A., ONLEY, J.H. y GAITHER, R.A. (1963). J. AOAC. 46, 186.

- 116.- MONOD, J.L. (1977). Trav. Soc. Pharm. Montpellier. 37, Fas. 1., 9.
- 117.- MONOD, J., WYMAN, J. y CHANGEUX, J. (1965). J. Mol. Biol. 12, 88.
- 118.- MUSTAFA, T. y HOCHACHKA, P.W. (1971). J. Biol. Chem. 246, 3196.
- 119.- NAGAYAMA, F. (1961). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 27, 1014.
- 120.- NEILANDS, J.B. y STUMPF, P. (1955). En "Outlines of Enzyme Chemistry" (ed. J. Wiley). New York. p. 24.
- 121.- NEWSHOLME, E.A. y START, C. (1973). En "Regulation in metabolism" (ed. J. Wiley). New York. p. 349.
- 122.- ONIKIENKO, F.A. (1966). Vopr. Med. Khim. 12, 297.
- 123.- OTHMAR, G. (1971). En "Methods in Enzimology" (ed. S.P. Colowick y N.O. Kaplan). 22, 565.
- 124.- PASSERON, S., JIMENEZ DE ASUA, L. y CARMINATTI, H. (1967). Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 33.
- 125.- PERTIERRA, E. y GALVEZ, M. (1976-1977). An. Inst. Invest. Veterin. 24, 139.

- 126.- PFLUGMACHER, J. y EBING, W. (1974). J. Chromatog. 93, 457.
- 127.- PLAPP, F.W. (1970). J. Econ. Entomol. 63, 1768.
- 128.- PORTMANN, J.E. (1968). Helgol. wiss. Meeresunters. 17, 247.
- 129.- PORTMANN, J.E. (1970). Shellfish information leaflet No. 19. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Burnham-on-Crouch.
- 130.- PRIEGO, J. (1977). Tesis doctoral. Univ. Complutense. Madrid.
- 131.- PURICH, D.L. y FROMM, H.J. (1972). Biochem. J. 130, 63.
- 132.- RANDERS, J. y MEADOWS, D.L. (1972). En "Los límites del crecimiento" Ed. Fondo de cultura económico de México.
- 133.- ROBERTS, D. (1972). Mar. Biol. 16, 119.
- 134.- ROBERTS, D. (1973). PhD thesis, Liverpool University.
- 135.- ROBINSON, J., RICHARDSON, A., CRABTREE, A.N., COULSON, J.C. y POTTS, G.R. (1967). Nature. London. 214. 1307.
- 136.- ROZENGURT, E., JIMENEZ DE ASUA, L. y CARMINATTI, H. (1970). Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 11, 284.

- 137.- SADAR, M.H. y GUILBAULT, G.G. (1971). J. Agr. Food. Chem. 19, 357.
- 138.- SASTRY, K.V. y SHARMA, S.K. (1978). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 20, 456.
- 139.- SCATCHARD, G. (1949). Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660.
- 140.- SCRUTTON, M.C. y UTTER, M.F. (1968). Ann. Rev. Biochem. 37, 249.
- 141.- SEUBERT, W., HENNING, H.V., SCHONER, W. y L'AGE, M. (1968) Adv. Enzyme Regul. 6, 153.
- 142.- SEUBERT, W. y SCHONER, W. (1971). En "Current Topics in Cellular Regulation" (ed. B.L. Horecker y E.R. Stadtman). Academic Press. Inc., New York and London. 3, 237.
- 143.- SHIBATA, T. (1977). PhD. thesis. Hokkaido University.
- 144.- SILVA, G.M., DOYLE, W.P. y WANG, C.H. (1959). Arq. Port. Biochim. 1
- 145.- SIMAL, J., CREUS, J.M., CHARRO, A., BOADO, M.A., DIAZ, R. y VILAS, D. (1971). Anal. Bromatol. 23, 1.
- 146.- SINGHAL, R.L. y KACEW, S. (1976). Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 35, 2618.

- 147.- SOLOWAY, S. (1965). Adv. Pest. Control Res. 6, 85.
- 148.- SOMERO, G.N. y HOCHACHKA, P.W. (1968). Biochem. J. 110, 395.-
- 149.- SOOT-RYEN, T. (1955). Allan Hancock Pacif. Exped. 20, 1.
- 150.- SPIEGEL, M.R.L. (1970). En "Teoría y problemas de estadística" (ed. Mac.Graw-Hill). México.
- 151.- SREBOCAN, V., POMPE-GOTAL, J., BRMALJ, V. y PLAZONIC, M. (1978). Veterinarski Archiv. 48. 111.
- 152.- STALLING, D.L. (1974). Conferencia Internacional sobre Química de Pesticidas. Helsinki.
- 153.- STALLING, D.L., TINDLE, R.C. y JOHNSON, J.L. (1972). J. AOAC. 55, 32.
- 154.- STEWART, G.R. y MOORE, D. (1971). J. Gen. Microbiol. 66, 361.
- 155.- STOKES, T.M. y AWAPARA, J. (1968). Comp. Biochem. Physiol. 25, 883.
- 156.- STORY, K.V. y FREEDLAND, R.A. (1978). Toxicol. Appl. Pharmacol. 43, 547.

- 157.- STRATHMANN, R. (1974). Am. Nat. 108, 29.
- 158.- SWEENEY, J.R. y FISHER, J.R. (1968). Biochemistry 7, 561.
- 159.- TANAKA, T., SUE, F. y MORIMURA, H. (1967), Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 444.
- 160.- TANAKA, T., HARANO, J., MORIMURA, H. y MORI, R. (1965), Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 55.
- 161.- TAYLOR, C.B. y BAYLE, E. (1967). Biochem. J. 102, 32c.
- 162.- TEJEDOR, C. (1977). Tesis Doctoral. Univ. Complutense. Madrid.
- 163.- TINSLEY, I.J. (1964). Nature (London) 202, 1113.
- 164.- TOUMINEN, F.W. y BERNLOHR, R.W. (1971), J. Biol. Chem. 246, 1732.
- 165.- UKELES, R. (1962). Appl. microbiol. 10, 532.
- 166.- URBIETA, M.A. y RUIZ-AMIL, M. (1975). VI Congreso S.E.B. p. 140. Sevilla.
- 167.- VAN BERKEL, T.J.C. y KOSTER, J.F. (1973). Biochem. Biophys. Acta. 293, 134.

- 168.- VAN MARREWIJK, W.J.A., HOLWERDA, D.A. y DE ZWAAN, A.
(1973). Neth. J. Zool. 3, 229.
- 169.- WALKER, P.R. y POTTER, V.R. (1973). J. Biol. Chem. 248,
4610.
- 170.- WEBER, G., LEE, M.A. y STAMM, N.B. (1968). Advan. Enzyme
Regul. 6, 101.
- 171.- WIDDOWS, J., BAYNE, B.L., LIVINGSTONE, D.R., NEWELL, R.
I.E. y DONKING, P. (1979). Comp. Biochem. Physiol. 62A, 301.
- 172.- WIELAND, O., MENAHAN, L.A. y VON JAGOW-WETERMANN, B.
(1970). En "Metabolic regulation of enzyme action" (ed.
A. Sols y S. Grisolia). Academic Press. New York. p. 77.
- 173.- WILLIAMS, R.J. (1970). Comp. Biochem. Physiol. 35, 145.

